

**Expression spannungsabhängiger
Na⁺- und Ca²⁺-Ströme
in differenzierenden Vertebraten-
und Invertebratenneuronen**

Kurt Gottmann

München 1989

1989

Expression spannungsabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme in
differenzierenden Vertebraten- und Invertebratenneuronen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches für Biologie
der Ludwigs-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von Kurt Gottmann
aus München

1. Berichterstatte: Prof. Dr. H. Wiczorek

2. Berichterstatte: Prof. Dr. C.N. David

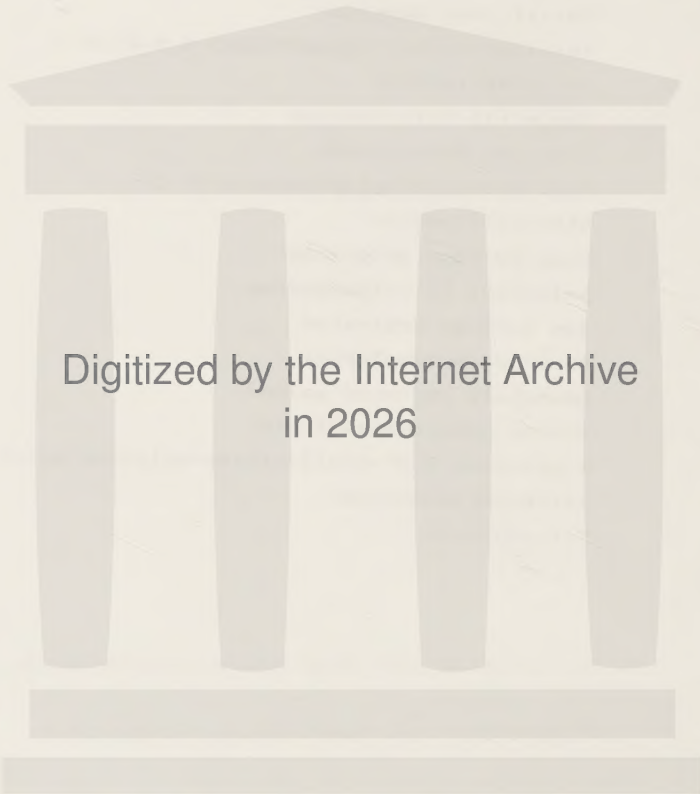
Sondervotum: Prof. Dr. H.D. Lux

Tag der mündlichen Prüfung:

19.12.1988

Abkürzungen

4-AP	4-Aminopyridin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CG	Ciliarganglion
CNTF	ciliary neuronotrophic factor
DRG	dorsal root ganglion
EGTA	(Bis(aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N',-tetraesssigssäure
F14	Ham's F14-Kulturmedium
FCS	foetales Kälberserum
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HVA	high voltage activated
L15	Leibowitz 15-Kulturmedium
LVA	low voltage activated
NGF	Nervenwachstumsfaktor
PBS	phosphate buffered saline
PC-12	Pheochromocytozelllinie
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethane-sulfonic acid)
TEA	Tetraethylammonium
TTX	Tetrodotoxin



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
A. Einleitung.....	5
1. Neuronale Differenzierung als Sonderfall der Ausprägung zelltypspezifischer Eigenschaften.....	5
2. Konzepte zur Expression von Ionenkanälen in differenzierenden Neuronen.....	7
3. Entwicklung der elektrischen Erregbarkeit und Veränderungen der Ionenabhängigkeit des Aktionspotentials in embryonalen Neuronen.....	10
4. Neuralleistenzellen und -derivate als Modellsysteme für neuronale Differenzierung.....	13
5. Embryonale Blutegelneurone als Modellsystem für neuronale Differenzierung in Invertebraten.....	17
B. Fragestellung.....	21
C. Materialien und Methoden.....	24
1. Zellkulturen.....	24
1.1. Isolierung und Kultivierung neuronaler Vorläuferzellen aus dem Hinterwurzel- und Ciliarganglion des Hühnchen-embryos.....	24
1.2. Kultivierung von proliferierenden sympathischen Neuronen und differenzierten Ciliarneuronen aus Hühnchen-embryonen.....	25
1.3. Kultivierung embryonaler Blutegelneurone.....	27
2. Messung von Ionenströmen mit Hilfe der Ganzzellableitung der patch-clamp-Technik.....	29
2.1. Allgemeines zur Ganzzellableitung.....	29
2.2. Ableitbedingungen.....	32
2.3. Extra- und intrazelluläre Lösungen.....	33
3. Histologische Darstellung embryonaler Blutegelneurone...	35
D. Ergebnisse.....	37

1. Expression spannungsabhängiger Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Ströme in neuronalen Vorläuferzellen aus dem Hinterwurzelganglion....	37
1.1. Messung von Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Strömen in Isolation.....	37
1.2. Expression von Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Strömen in kultivierten DRG-Vorläuferzellen.....	40
1.2.1. Expression von Na ⁺ -Strömen.....	40
1.2.2. Expression von Ca ²⁺ -Strömen.....	42
1.2.3. Zeitliche Relation der Expression von Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Strömen.....	45
1.3. Abhängigkeit der Amplitude und Stromdichte von Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Strömen vom Differenzierungszustand.....	45
1.4. Pharmakologische Blockierbarkeit und Haltepotentialabhängigkeit von Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Strömen kurz nach Beginn ihrer Expression.....	48
1.4.1. TTX-Blockierbarkeit früher Na ⁺ -Ströme.....	48
1.4.2. Cd ²⁺ -Blockierbarkeit und Haltepotentialabhängigkeit früher Ca ²⁺ -Ströme.....	49
1.5. pH-induzierte Na ⁺ -Ströme.....	49
2. Zeitliche Relation der Expression von spannungsabhängigen Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Strömen zur terminalen Mitose.....	56
2.1. Zeitliche Relation zur terminalen Mitose in DRG-Vorläuferzellen.....	56
2.2. Zeitliche Relation zur terminalen Mitose in sympathischen Neuronen.....	58
3. Abhängigkeit der Expression spannungsabhängiger Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Ströme vom Zelltyp.....	58
3.1. Unabhängigkeit der Expression von Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Strömen vom Vorhandensein ausdifferenzierter Gliazellen.....	60
3.2. K ⁺ -Ströme in Ciliarvorläuferzellen nach 1-5 Stunden in Kultur.....	61
3.3. Expression von Na ⁺ - und Ca ²⁺ -Strömen in kultivierten Ciliarvorläuferzellen.....	61
3.3.1. Expression von Na ⁺ -Strömen.....	63
3.3.2. Expression von Ca ²⁺ -Strömen.....	63

3.3.3. Vergleich der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in Ciliar- und DRG-Vorläuferzellen.....	66
3.4. Abhängigkeit der Amplitude von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in Ciliar- und DRG-Vorläuferzellen vom Differenzierungszustand.....	69
3.5. Ca^{2+} -Ströme in differenzierten Ciliarneuronen.....	71
3.6. Pharmakologische Blockierbarkeit und Haltepotentialabhängigkeit von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in kultivierten Ciliarvorläuferzellen.....	73
3.6.1. TTX-Blockierbarkeit früher Na^+ -Ströme.....	73
3.6.2. Cd^{2+} -Blockierbarkeit und Haltepotentialabhängigkeit früher Ca^{2+} -Ströme.....	73
4. Expression von spannungsabhängigen Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in embryonalen Blutegelneuronen.....	76
4.1. Morphologische Entwicklung des Blutegel-ZNS und Definition von Entwicklungsstadien.....	76
4.2. Morphologische Differenzierung embryonaler Retziuszellen.....	79
4.3. Entwicklung von Größenunterschieden zwischen embryonalen Neuronen verschiedenen Zelltyps.....	83
4.4. Regeneration dissoziierter embryonaler Neurone in Kultur.....	87
4.5. Spannungsabhängige Na^+ -und Ca^{2+} -Ströme in embryonalen Neuronen am 9.Embryonaltag.....	87
4.5.1. Spannungsabhängige Na^+ -Ströme.....	89
4.5.1.1. Na^+ -Ströme in auffällig großen embryonalen Neuronen.....	89
4.5.1.2. Na^+ -Ströme in kleinen embryonalen Neuronen.....	89
4.5.2. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Ströme.....	92
4.5.2.1. Ca^{2+} -Ströme in auffällig großen embryonalen Neuronen.....	92
4.5.2.2. Ca^{2+} -Ströme in kleinen embryonalen Neuronen.....	95
4.6. Zeitliche Relation des Auftretens von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen zum Beginn des Neuritenwachstums.....	95
4.6.1. Na^+ -Ströme in embryonalen Neuronen an E7.....	97
4.6.2. Ca^{2+} -Ströme in embryonalen Neuronen an E7.....	97

4.6.3. Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme in embryonalen Neuronen an E8.....	97
4.7. Abhängigkeit der Eigenschaften von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen vom Entwicklungsalter.....	101
4.7.1. Abhängigkeit der Kinetik und Spannungsabhängigkeit von Na^+ -Strömen vom Entwicklungsalter.....	101
4.7.2. Abhängigkeit der Kinetik und Spannungsabhängigkeit von Ca^{2+} -Strömen vom Entwicklungsalter.....	101
4.7.3. Abhängigkeit der Amplitude von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen vom Entwicklungsalter.....	102
E. Diskussion.....	105
1. Zeitpunkt der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen im Verlauf der neuronalen Differenzierung.....	105
1.1. Zeitliche Relation zur terminalen Mitose.....	105
1.2. Zeitliche Relation zum Beginn des Neuritenwachstums.....	106
2. Zeitliche Sequenz der Expression von Ionenströmen.....	108
2.1. Zeitliche Sequenz der Expression verschiedener Typen von Ca^{2+} -Strömen.....	109
3. Eigenschaften früher Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme.....	110
4. Abhängigkeit der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen vom Zelltyp.....	112
Literaturverzeichniss.....	115

Zusammenfassung

Die Expression spannungsabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme, die für die Fähigkeit zur elektrischen Erregbarkeit von entscheidender Bedeutung sind, wurde mit Hilfe der Ganzzellableitung der patch-clamp-Technik (Hamill et al., 1981) in differenzierenden Neuronen untersucht. Neuronale Vorläuferzellen aus dem sensorischen Hinterwurzelganglion ("dorsal root ganglion", DRG) und aus dem parasympathischen Ciliarganglion des Hühnchenembryos können mit Hilfe Komplement-vermittelter Lyse bereits differenzierter Neurone isoliert werden und differenzieren in Kultur zu Neuronen aus (Rohrer et al., 1985). Die Expression von Ionenströmen während der ersten 30 Stunden in Kultur wurde in diesen beiden Zelltypen miteinander verglichen. Weiterhin wurde die Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in embryonalen Invertebratenneuronen aus *Hirudo medicinalis*, die durch Dissoziation embryonaler Ganglien zu Einzelzellen erhalten werden konnten, untersucht und mit der morphologischen Differenzierung korreliert.

1. Es konnte gezeigt werden, daß neuronale DRG-Vorläuferzellen spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme bereits kurz nach der terminalen Mitose und in einem streng definierten zeitlichen Abstand zur terminalen Mitose exprimieren. In proliferierenden sympathischen Neuronen jedoch, die auch andere neuronale Eigenschaften bereits vor der terminalen Mitose besitzen, waren spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme bereits vor der terminalen Mitose vorhanden.

Embryonale Retzius-Zellen aus *Hirudo medicinalis* konnten aufgrund ihrer Fähigkeit zur Dopaminaufnahme histologisch dargestellt werden und es konnte gezeigt werden, daß das Neuritenwachstum am 7. Embryonaltag, etwa gleichzeitig mit der morphologischen Ausbildung der Ganglien, beginnt. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits in einem Teil der in den embryonalen Ganglien enthaltenen Zellen mit neuronaler Morphologie spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme nachweisbar. Einen Tag später waren auffällige Größenunterschiede im Soma-

durchmesser der embryonalen Blutegelneurone sichtbar, die es erlaubten, eine Population auffällig großer embryonaler Neurone zu isolieren. Diese auffällig großen embryonalen Neurone stellen wahrscheinlich embryonale Retzius-Zellen dar. Fast alle dieser Zellen zeigten am 8. Embryonaltag spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme. Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle scheinen daher bereits zu Beginn des Neuritenwachstums in der Membran embryonaler Blutegelneurone vorhanden zu sein.

Da spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme spätestens kurz nach der terminalen Mitose und bereits zu Beginn des Neuritenwachstums vorhanden waren, erscheint es möglich, daß sie eine wesentliche Rolle in Differenzierungsprozessen, wie etwa der Steuerung des Neuritenwachstums und dem Auffinden der richtigen Zielzellen, spielen.

2. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß differenzierende Neurone nicht über einen längeren Zeitraum entweder nur Na^+ - oder nur Ca^{2+} -Ströme exprimieren. In embryonalen Blutegelneuronen und in differenzierenden Ciliarvorläuferzellen waren sowohl Na^+ - als auch Ca^{2+} -Ströme bereits zum frühest möglichen Zeitpunkt, an dem die Zellen untersucht werden konnten, vorhanden. Das längste beobachtete Zeitintervall, in dem differenzierende Neurone nur einen Ca^{2+} -Strom zeigten, betrug im Falle der DRG-Vorläuferzellen 15 Stunden.

Differenzierte DRG-Neurone besitzen neben dem spannungsabhängigen Na^+ -Strom zwei Typen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Strömen, LVA-("low voltage activated") und HVA-("high voltage activated") Ca^{2+} -Ströme, die durch das Vorhandensein von zwei Typen von Ca^{2+} -Kanälen zustandekommen (Carbone und Lux, 1984a; 1984b). In Rohrer et al., 1985 konnte gezeigt werden, daß in DRG-Vorläuferzellen der LVA- Ca^{2+} -Strom deutlich vor dem HVA- Ca^{2+} -Strom exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die gleiche Sequenz der Expression der zwei Typen von Ca^{2+} -Strömen für differenzierende Ciliarvorläuferzellen gezeigt. In embryonalen Blutegelneuronen dagegen konnten verschiedene Typen von Ca^{2+} -Strömen nicht nachgewiesen werden.

Die erstmals bei DRG-Vorläuferzellen (Rohrer et al., 1985) beschriebene Sequenz der Expression der zwei Typen von Ca^{2+} -Strömen scheint daher für Vertebratenneurone allgemeine Gültigkeit zu haben, jedoch nicht für embryonale Blutegelneurone, die in der untersuchten Zeitspanne nur einen Typ von Ca^{2+} -Kanälen exprimierten.

3. Spannungsabhängige Na^{+} - und Ca^{2+} -Ströme in differenzierenden Hühnchenneuronen zeigten bereits zu Beginn ihrer Expression eine vergleichbare Kinetik und Spannungsabhängigkeit wie in differenzierten DRG-Neuronen. Auch in den pharmakologischen Eigenschaften (TTX-Blockierbarkeit der Na^{+} -Ströme; Cd^{2+} -Blockierbarkeit der Ca^{2+} -Ströme und pH-induzierte Transformation von Ca^{2+} -Kanälen) unterschieden sich Na^{+} - und Ca^{2+} -Ströme kurz nach Beginn ihrer Expression nicht von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen in differenzierten Neuronen. Na^{+} - und Ca^{2+} -Kanäle scheinen daher bereits zu Beginn der Expression von Ionenströmen die gleiche molekulare Struktur zu besitzen wie in differenzierten Neuronen. Auch bei embryonalen Blutegelneuronen konnte keine Veränderung der Eigenschaften von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen im untersuchten Zeitraum der embryonalen Entwicklung beobachtet werden, jedoch waren speziespezifische Unterschiede zu Hühnchenneuronen (TTX-Insensitivität der Na^{+} -Ströme; nur ein Typ von Ca^{2+} -Strömen) bereits bei embryonalen Neuronen beobachtbar.

4. Die frühe Expression von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen erfolgte in DRG- und Ciliarvorläuferzellen nicht in der gleichen Weise; es konnten daher bereits zu Beginn der Expression von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen zelltypspezifische Unterschiede beobachtet werden. In Ciliarvorläuferzellen trat der Na^{+} -Strom deutlich vor dem HVA- Ca^{2+} -Strom auf, während beide Ströme in DRG-Vorläuferzellen gleichzeitig exprimiert wurden. Darüberhinaus war das Verhältnis von LVA- zu HVA- Ca^{2+} -Strömen in Ciliarvorläuferzellen deutlich geringer als in DRG-Vorläuferzellen, was auf eine schwächere Expression des LVA- Ca^{2+} -Stroms in Ciliarvorläuferzellen hindeutet. Diese frühen Unterschiede zeigen, daß nicht zunächst ein

allen Neuronentypen gemeinsames Stadium eines unreifen Neurons durchlaufen wird, sondern die verschiedenen Differenzierungswege bereits zu Beginn der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen unterschiedlich verlaufen.

A. Einleitung

1. Neuronale Differenzierung als Sonderfall der Ausprägung zelltypspezifischer Eigenschaften

Die Entstehung eines vielzelligen Organismus aus einer befruchteten Eizelle beinhaltet einerseits Zellproliferation und andererseits Differenzierungsprozesse der embryonalen Zellen. Aufgrund dieser Differenzierungsprozesse kommt es zur Ausbildung einer Vielzahl unterschiedlicher, hoch spezialisierter Zelltypen. Besonders beeindruckend ist die Ausbildung spezifischer Eigenschaften im Falle der Differenzierung von Nervenzellen.

Neurone unterscheiden sich von anderen Zelltypen bereits durch ihre morphologische Erscheinungsform; sie senden vom Zellsoma ausgehend mitunter extrem lange Neurite aus, die sich in komplexer Weise verzweigen können. An der Spitze wachsender Neurite findet sich eine charakteristische Struktur, der Wachstumskegel. Dem Wachstumskegel wird eine entscheidende Bedeutung für die Steuerung des Neuritenwachstums zugeschrieben (Goodman und Bastiani, 1985; Lockerbie, 1987).

Um ihre spezifische Funktion im Gesamtorganismus erfüllen zu können, besitzen Neurone die Fähigkeit zur Ausbildung synaptischer Strukturen. Sie enthalten in den präsynaptischen Endigungen in synaptischen Vesikeln gespeicherte Transmittersubstanzen, spezialisierte präsynaptische Membranbereiche und die zur Transmittersynthese notwendigen Enzyme. In den postsynaptischen Membranbereichen finden sich Transmitterrezeptoren, die für die Erzeugung postsynaptischer Potentialänderungen verantwortlich sind.

Entscheidend für die Funktion von Neuronen ist ihre Fähigkeit zur elektrischen Erregbarkeit. Nervenzellmembranen sind in der Lage, Aktionspotentiale zu erzeugen, die aus einer wenige Millisekunden andauernden, sehr starken Depolarisation des Ruhemembranpotentials bestehen. Aktionspotentiale werden durch eine überschwellige Depolarisation

der Membran ausgelöst und breiten sich entlang der Plasmamembran aus (Katz, 1979). Diese Fähigkeit zur Ausbildung von Aktionspotentialen ermöglicht es Nervenzellen ihre einzigartige Integrationsfunktion im Gesamtorganismus zu erfüllen. Durch Veränderung der zeitlichen Abfolge von Aktionspotentialen ist es Nervenzellen möglich, Informationen zu kodieren. Darüberhinaus sind Aktionspotentiale in präsynaptischen Endigungen in der Lage, in einem Ca^{2+} -abhängigen Prozeß die Freisetzung von Transmittersubstanzen auszulösen (Katz, 1979). Die Membran des postsynaptischen Neurons ist so in der Lage, die in Aktionspotentialen kodierte Information verschiedener präsynaptischer Neurone zu integrieren und zu verarbeiten.

Aktionspotentiale werden verursacht durch das fein abgestimmte Zusammenspiel von Ionenströmen durch die Plasmamembran (Hodgkin und Huxley, 1952a,b). Die molekulare Grundlage für die Erzeugung von Ionenströmen stellen in die Plasmamembran integrierte, spezifische Proteine dar, die als Ionenkanäle fungieren. Diese spannungsabhängigen Ionenkanäle öffnen sich bei Depolarisation des Membranpotentials und zeigen eine strenge Selektivität für bestimmte Ionen. Aufgrund ihrer Ionenselektivität können verschiedene Typen von spannungsabhängigen Ionenkanälen unterschieden werden. Na^{+} - (Hille, 1984) bzw. Ca^{2+} -selektive Kanäle (Hagiwara und Byerly, 1981; Brown et al., 1982), führen unter physiologischen intra- und extrazellulären Ionenverteilungen zu zelleinwärts gerichteten Ionenströmen. Diese Einwärtsströme führen zu einer verstärkten Depolarisation der Membran und sind daher für die Entstehung eines Aktionspotentials von entscheidender Bedeutung. K^{+} -selektive Kanäle, deren Öffnung zu auswärts gerichteten Ionenströmen führt, sind nach Auslösung eines Aktionspotentials für die schnelle Repolarisierung der Membran von Bedeutung.

Der Beginn der Expression dieser Ionenkanäle stellt, abgesehen von Muskelzellen, einen für die neuronale Differenzierung spezifischen Prozeß dar. Die Untersuchung der funktionell so entscheidenden spannungsabhängigen Ionenkanäle

in differenzierenden Neuronen ist daher für das Verständnis neuronaler Differenzierung von wesentlicher Bedeutung.

Entsprechend den vielfältigen Aufgaben von Nervenzellen im Gesamtorganismus entsteht während der Embryogenese eine Vielfalt von spezialisierten Subtypen von Neuronen. Die verschiedenen Neuronentypen stimmen im Vorhandensein spannungsabhängiger Ionenkanäle überein, jedoch können sie sich bezüglich der verschiedenen Typen von Ionenkanälen unterscheiden (Carbone und Lux, 1986a).

2. Konzepte zur Expression von Ionenkanälen in differenzierenden Neuronen

Die Ausbildung der Fähigkeit zur elektrischen Erregbarkeit erfordert die Expression spezifischer Proteine, die nach ihrer Integration in die Plasmamembran als spannungsabhängige Ionenkanäle fungieren. In den Membranen differenzierender embryonaler Neurone sind grundsätzlich drei Arten des Vorhandenseins spannungsabhängiger Ionenkanäle denkbar:

i.) Die für die Ausbildung spannungsabhängiger Ionenkanäle notwendigen Proteine werden von der Zelle exprimiert und sind in die Plasmamembran integriert. Diese membranintegrierten Vorstufen von Ionenkanälen sind jedoch in einem inaktiven Zustand, d.h. sie sind nicht in der Lage sich membranpotentialabhängig zu öffnen. Insbesondere Ca^{2+} -Kanäle könnten als inaktive Vorstufen vorhanden sein, da ihre Funktionsfähigkeit abhängig vom Metabolismus der Zelle ist (Kostyuk et al., 1981). So konnten in der Membran differenzierender Muskelzellen von *Drosophila* inaktive Ca^{2+} -Kanäle, die durch Injektion von ATP oder EGTA aktiviert werden konnten, nachgewiesen werden (Wei und Salkoff, 1986). Ebenso war es in *Aplysianeuronen* möglich, nach Proteinkinase C-Stimulation einen sonst nicht meßbaren Ca^{2+} -Kanal in Einzelkanalableitungen nachzuweisen (Strong et al., 1987).

ii). Spannungsabhängige Ionenkanäle könnten als funktionsfähige embryonale Vorstufen vorhanden sein, die sich

jedoch in ihren Eigenschaften von den Kanälen adulter Nervenzellen unterscheiden. Diese Unterschiede würden sich dann als veränderte Kinetik, Membranpotentialabhängigkeit oder Pharmakologie der durch die Ionenkanäle bedingten Ionenströme niederschlagen. Solche embryonalen Vorstufen von Ionenkanälen könnten bedingt sein durch die Expression spezieller embryonaler Kanalproteine, die sich in ihrer molekularen Struktur von adulten Kanälen unterscheiden. Eine solche veränderte Genexpression in embryonalen Zellen konnte für differenzierende Muskelzellen gezeigt werden (siehe Übersichtsartikel von Schuetze, 1986). Der durch Acetylcholin in embryonalen Zellen auslösbare Ionenstrom unterscheidet sich in seiner Kinetik wesentlich von dem postnataler Zellen (Sakmann und Brenner, 1978). Dieser Unterschied konnte zurückgeführt werden auf das Vorhandensein eines embryonalen durch Acetylcholin geöffneten Ionenkanals mit geringerer Leitfähigkeit und erhöhter Offenzeit (Mishina et al., 1986). Der nikotinische Acetylcholinrezeptor ist aufgebaut aus mehreren Untereinheiten verschiedener Amino-säuresequenz (Noda et al., 1983; Takai et al., 1985). Es konnte gezeigt werden, daß die mRNA für die ϵ -Untereinheit in embryonalen Zellen, postnatal dagegen statt der mRNA für die ϵ -Untereinheit die mRNA für die γ -Untereinheit exprimiert wird (Mishina et al., 1986). Die verschiedenen Arten von mRNS-Molekülen, die jeweils für eine Art von Untereinheit ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$ oder ϵ) kodieren, konnten nach Injektion in *Xenopus* Oozyten exprimiert werden und die entsprechenden Proteine bildeten einen funktionalen Ionenkanal in der Oozytenmembran. Je nach Art der injizierten mRNS-Moleküle ($\alpha, \beta, \delta, \epsilon$ oder $\alpha, \beta, \delta, \gamma$) wurden entweder Ionenkanäle embryonalen oder adulten Typs exprimiert (Mishina et al., 1986). Diese Experimente zeigen, daß die Expression einer für embryonale Zellen spezifischen Untereinheit verantwortlich ist für die veränderten Kanaleigenschaften.

iii.) Im Gegensatz dazu könnten spannungsabhängige Ionenkanäle jedoch auch unmittelbar nach der Translation der entsprechenden mRNA und der Integration in die Plasmamembran

bereits die gleichen Eigenschaften wie adulte Kanäle aufweisen. Dies würde bedeuten, daß sich kein Unterschied in der Kinetik, Membranpotentialabhängigkeit und Pharmakologie der Ionenströme embryonaler und adulter Zellen feststellen läßt.

Spannungsabhängige Ionenkanäle dienen in adulten Neuronen in erster Linie der Signalerzeugung und -weiterleitung. In embryonalen Nervenzellen dagegen können spannungsabhängige Ionenkanäle, vor allem Ca^{2+} -Kanäle, auch mit Prozessen wie der Kontrolle des Neuritenwachstums und dem Auffinden der richtigen Zielzellen in Verbindung gebracht werden. Insbesondere die spezifische Lokalisation von Ca^{2+} -Kanälen in den Wachstumskegeln auswachsender Neurite, wie bei PC-12 Zellen in Kultur gezeigt werden könnte (Streit und Lux, 1988), läßt eine Funktion für die Differenzierungsprozesse embryonaler Neurone vermuten. In diesem Zusammenhang ist der Zeitpunkt des Auftretens von spannungsabhängigen Ionenkanälen innerhalb der Differenzierung einer Vorläuferzelle zum adulten Neuron von Interesse. Im Verlauf der neuronalen Differenzierung können neben dem Zeitpunkt des Auftretens von Ionenkanälen drei weitere entscheidende Zeitpunkte definiert werden:

i.) die terminale Mitose, nach der die Neuronenvorläufer ihre Teilungsfähigkeit verlieren.

ii.) der Beginn des Neuritenwachstums, der die morphologische Differenzierung der Neurone einleitet.

iii.) die Ausbildung synaptischer Strukturen, die ein funktionsfähiges embryonales Nervensystem ermöglichen.

Die Kenntnis der zeitlichen Relation dieser Ereignisse zum Auftreten spannungsabhängiger Ionenkanäle ist für die Einschätzung der Bedeutung dieser Kanäle für neuronale Differenzierungsprozesse wesentlich.

Im Verlauf der Embryogenese entstehen verschiedene Subtypen von Neuronen, die basale neuronale Eigenschaften, wie die elektrische Erregbarkeit gemeinsam haben. Diese

verschiedenen Typen von Nervenzellen unterscheiden sich jedoch in der speziellen Ausprägung dieser Eigenschaften; so ist bei verschiedenen Neuronentypen zum Beispiel die Art des synthetisierten Neurotransmitters verschieden. Verschiedene Neuronentypen können sich auch bezüglich ihrer spannungsabhängigen Ionenkanäle unterscheiden, so finden sich bei ausdifferenzierten DRG-Neuronen LVA- und HVA- Ca^{2+} -Kanäle (Carbone und Lux, 1984b), während bei ausdifferenzierten sympathischen Neuronen nur HVA- Ca^{2+} -Kanäle nachweisbar sind (Marchetti et al., 1986; Schofield und Ikeda, 1988).

Es existieren zwei denkbare Wege, wie es zur Ausbildung solcher Zelltypunterschiede kommt:

i.) Vorläuferzellen, die noch keine neuronalen Eigenschaften besitzen, bilden zunächst basale neuronale Eigenschaften aus. Es entstehen so unreife Neurone, die, unabhängig davon, zu welchem Zelltyp sie später differenzieren, alle die gleichen neuronalen Eigenschaften aufweisen. Erst nach der Ausbildung basaler neuronaler Eigenschaften trennen sich die Differenzierungswege verschiedener Neuronentypen.

ii.) Die Vorläuferzellen verschiedener Neuronentypen unterscheiden sich bereits in der Ausbildung der ersten neuronalen Eigenschaften. Es gibt daher kein allen Neuronentypen gemeinsames Stadium eines unreifen Neurons; die Differenzierungswege verschiedener Neuronentypen verlaufen von Anfang an unterschiedlich.

Solche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten bezüglich der Expression spannungsabhängiger Ionenkanäle können bestehen hinsichtlich der zeitlichen Reihenfolge, in der die verschiedenen Typen von Ionenkanälen auftreten, und sie können bestehen hinsichtlich der relativen Proportionen, in denen diese Ionenkanäle exprimiert werden.

3. Entwicklung der elektrischen Erregbarkeit und Veränderungen der Ionenabhängigkeit des Aktionspotentials in embryonalen Neuronen

Die Ausbildung der Fähigkeit embryonaler Neurone zur elektrischen Erregbarkeit läßt sich mit Hilfe intrazellulärer Ableitungen von Aktionspotentialen verfolgen. Auf diese Weise ist es möglich, den Zeitpunkt des ersten Auftretens von Aktionspotentialen zu bestimmen und entwicklungsbedingte Veränderungen im zeitlichen Verlauf, in der Abhängigkeit von extrazellulären Ionen und in der pharmakologischen Blockierbarkeit von Aktionspotentialen zu beobachten.

In frühen neuronalen Vorläuferzellen von Amphibien sind zunächst keine Aktionspotentiale nachweisbar, wie für Rohon-Beard-Neurone 6 Stunden nach ihrer letzten DNS-Synthesephase gezeigt werden konnte (Spitzer, 1983). Embryonale Rohon-Beard-Neurone entwickeln dann innerhalb weniger Stunden die Fähigkeit zur elektrischen Erregbarkeit, zunächst in Form von mehreren hundert Millisekunden andauernden Aktionspotentialen. Diese frühen Aktionspotentiale sind hauptsächlich von einem Ca^{2+} -Einstrom abhängig, wie durch Ionensubstitutionsexperimente und durch pharmakologische Blockierung von Ca^{2+} -Kanälen gezeigt werden konnte. Später in der Entwicklung kommt es zum Auftreten einer Na^{+} -abhängigen Komponente des Aktionspotentials. Es besteht nun aus einer schnellen Na^{+} -abhängigen und einer langsamen Ca^{2+} -abhängigen Komponente. Die Gesamtdauer dieser Aktionspotentiale liegt in der Größenordnung von 10 Millisekunden. Einige Tage später schließlich besteht das Aktionspotential hauptsächlich aus einer Na^{+} -abhängigen Komponente und dauert nur noch ungefähr eine Millisekunde an (Spitzer und Baccaglini, 1976; Baccaglini und Spitzer, 1977). Eine ähnliche Sequenz findet sich auch bei in Kultur differenzierenden Amphibienneuronen (Spitzer und Lamborghini, 1976) und in einer Reihe von verschiedenen Neuronentypen aus verschiedenen Spezies (Spitzer, 1983).

Eine abweichende Sequenz ist für embryonale Heuschreckenneurone beschrieben worden (Goodman und Spitzer, 1981). Zunächst läßt sich ein Aktionspotential geringer Amplitude, das bei Substitution des extrazellulären Na^{+} durch Cholin verschwindet, nachweisen. Dieses Na^{+} -abhängige

Aktionspotential scheint im Axon erzeugt und passiv ins Zellsoma propagiert zu werden. Es ist durch den Na^+ -Kanalblocker Tetrodotoxin (TTX) blockierbar, wogegen der Ca^{2+} -Kanalblocker Co^{2+} keinen Effekt auf das Aktionspotential zeigt. Langandauernde Ca^{2+} -abhängige Aktionspotentiale sind in diesem Stadium nicht nachweisbar. Einen Tag später können im Soma entstehende Na^+ - und Ca^{2+} -abhängige Aktionspotentiale beobachtet werden. Nach Zugabe des K^+ -Kanalblockers Tetraethylammonium (TEA) läßt sich eine langandauernde Ca^{2+} -abhängige Komponente neben der Na^+ -Komponente nachweisen.

Zeitverlauf und Ionenabhängigkeit des Aktionspotentials sind abhängig von den dem Aktionspotential zugrundeliegenden Ionenströmen. Entwicklungsbedingte Veränderungen im Zeitverlauf und in der Ionenabhängigkeit können daher erklärt werden durch Veränderungen der Proportionen der beteiligten Ionenströme.

Die Untersuchung der Entwicklung spannungsabhängiger Ionenströme wurde an in Kultur differenzierenden Amphibienneuronen, die im Verlauf der Differenzierung eine Verkürzung des Aktionspotentials und einen Übergang von einem hauptsächlich Ca^{2+} -abhängigen zu einem hauptsächlich Na^+ -abhängigen Aktionspotential zeigen, durchgeführt (Barish, 1986; O'Dowd et al., 1988). Spannungsabhängige K^+ -, Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme waren bereits in den am wenigsten differenzierten Neuronen, die aufgrund des Auswachsens von Neuriten als unreife Neurone identifiziert werden konnten, nachweisbar. Die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Ströme zeigten, im Gegensatz zu den Na^+ -Strömen, während der Differenzierung in Kultur keine Zunahme der Stromdichte. Die weitaus deutlichste Zunahme der Stromdichte jedoch war bei den K^+ -Strömen beobachtbar, die zusätzlich in weiter differenzierten Neuronen eine schnellere Aktivierung zeigten.

Wie durch mathematische Rekonstruktion des Aktionspotentials aus den gemessenen Ionenströmen gezeigt werden konnte, ist die starke Zunahme der K^+ -Stöme verantwortlich für die Verkürzung des Aktionspotentials (Barish, 1986). Weiterhin läßt sich aus den beobachteten Veränderungen der

Stromdichten auch die Entwicklung der Ionenabhängigkeit des Aktionspotentials erklären.

Diese Untersuchungen zeigen, daß zum Zeitpunkt des ersten Auftretens von Aktionspotentialen sowohl Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme als auch K^+ -Ströme bereits vorhanden sind. Die entwicklungsbedingten Veränderungen des Aktionspotentials sind auf Veränderungen der Proportionen der verschiedenen Ionenströme zurückzuführen. Um den Zeitpunkt des ersten Auftretens von Ionenströmen zu bestimmen und die frühe Expression zu untersuchen, reicht es daher nicht aus, die Ionenabhängigkeit von Aktionspotentialen zu untersuchen. Vielmehr ist es notwendig, die verschiedenen Typen von Ionenströmen unter konstanten Membranpotentialbedingungen ("voltage-clamp") zu studieren. Darüberhinaus ist es erforderlich möglichst undifferenzierte Neurone zu untersuchen, da die Expression von Ionenströmen sehr früh im Verlauf der neuronalen Differenzierung zu erfolgen scheint.

4. Neuralleistenzellen und -derivate als Modellsysteme für neuronale Differenzierung

Im Vertebratenembryo entsteht während der Neurulation als dorsaler Anhang des sich schließenden Neuralrohrs die Neuralleiste. Die Neuralleistenzellen wandern später in der Entwicklung in lateraler Richtung aus und differenzieren sowohl zu neuronalen als auch nichtneuronalen Zellen (Le Douarin, 1982; Le Douarin, 1986). Unter den neuronalen Neuralleistenderivaten finden sich verschiedene neuronale Typen: unter anderem Neurone des Hinterwurzelganglions (sensorische Neurone), Neurone des Ciliarganglions (parasympathische Neurone) und sympathische Neurone. Neuralleistenzellen bieten daher die Möglichkeit verschiedene Differenzierungswege miteinander zu vergleichen.

Bringt man Neuralleistenzellen in Kultur, so differenzieren sie zu Neuronen aus (Bader et al., 1983). Kultivierte Neuralleistenzellen, die nach einem Tag in Kultur aufgrund ihrer Morphologie als Neurone identifiziert

werden können, sind zunächst nicht elektrisch erregbar. Nach 4 Tagen in Kultur jedoch können Aktionspotentiale beobachtet werden. Messungen der Ionenströme unter voltage-clamp-Bedingungen zeigen zunächst nur einen Auswärtsstrom, der blockierbar ist durch die K^+ -Kanalblocker 4-Aminopyridin (4-AP) und TEA. Die Ionenströme können zu diesem Zeitpunkt nicht beeinflusst werden durch Zugabe von TTX oder Co^{2+} , sodaß einwärts gerichtete Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme nicht nachgewiesen werden können. Nach 2 Tagen in Kultur jedoch läßt sich ein zusätzlicher, Na^+ -abhängiger, TTX-blockierbarer Einwärtsstrom beobachten. Etwa gleichzeitig ist ein durch Co^{2+} -blockierbarer Ca^{2+} -Strom vorhanden.

Diese Untersuchungen zeigen, daß in differenzierenden Neuralleistenzellen das erste Auftreten von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen untersucht werden kann. Um jedoch verschiedene Differenzierungswege miteinander vergleichen zu können, ist es notwendig, neuronale Vorläuferzellen aus verschiedenen peripheren Ganglien zu isolieren, die so eindeutig einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden können.

Embryonale Hinterwurzelganglien ("dorsal root ganglia", DRG) des Hühnchens enthalten bis zum 7. Embryonaltag neben Zellen, die bereits neuronale (neuronen-spezifische Antigene) oder gliale (glia-spezifische Antigene) Eigenschaften exprimieren, eine zusätzliche Population undifferenzierter Zellen (Rohrer et al., 1985). Diese Zellpopulation kann durch Zugabe von neuron- und glia-spezifischen Antikörpern und anschließende durch Komplement vermittelte Lyse der differenzierten Neurone und Gliazellen isoliert werden. Nach einer Stunde in Kultur ist bei einigen dieser isolierten Vorläuferzellen bereits das Auswachsen von Neuriten zu beobachten, sodaß neuronale Vorläuferzellen identifiziert werden können. Die Zahl der Zellen, die eine solche charakteristische neuronale Morphologie zeigen, hat nach 24 Stunden um das Fünffache zugenommen. Eine ähnliche Zunahme kann bezüglich der Anzahl der Zellen, die das neuron-spezifische Q211-Antigen (Polysialoganglioside) besitzen, beobachtet werden (Rohrer et al., 1985). Dies

zeigt, daß isolierte neuronale Vorläuferzellen in vitro neuronale Eigenschaften exprimieren und der Zeitverlauf der neuronalen Differenzierung in diesem Präparat im Bereich von Stunden untersucht werden kann.

Nach drei Stunden in Kultur können neuronale Vorläuferzellen identifiziert und die vorhandenen Ionenströme unter voltage-clamp-Bedingungen gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt ist in allen Zellen ein K^+ -Auswärtsstrom nachweisbar, jedoch zeigen nur ungefähr 50% der Zellen einen inaktivierenden Einwärtsstrom (Rohrer et al., 1985). Dieser Einwärtsstrom entspricht in seiner Kinetik und Spannungsabhängigkeit dem niederschwellig aktivierenden Ca^{2+} -Strom differenzierter DRG-Neurone (siehe unten). Nach einem Tag in Kultur sind zusätzlich schnell inaktivierende, TTX-blockierbare Na^+ -Ströme und nur sehr langsam inaktivierende Ca^{2+} -Ströme nachweisbar (Rohrer et al., 1985). Dies zeigt, daß die Isolierung neuronaler Vorläuferzellen es ermöglicht, das erste Auftreten von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen zu untersuchen.

Ein weiterer Vorteil, den neuronale Vorläuferzellen aus embryonalen Hinterwurzelganglien bieten, besteht darin, daß die Ionenströme in differenzierten DRG-Neuronen sehr intensiv untersucht worden sind. Differenzierte DRG-Neurone besitzen neben K^+ -Strömen einen durch TTX vollständig blockierbaren, schnell inaktivierenden Na^+ -Einwärtsstrom (Carbone und Lux, 1986b). Bei den Ca^{2+} -selektiven Ionenkanälen lassen sich zwei Typen unterscheiden; ein "low-voltage-activated (LVA)" und ein "high-voltage-activated (HVA)" Ca^{2+} -Kanal (Carbone und Lux 1984a,b; Fedulova et al., 1985; Bossu et al., 1985). Der LVA- Ca^{2+} -Strom aktiviert bei einem Membranpotential zwischen -60 und -50 mV, inaktiviert vollständig innerhalb von 100 ms und ist nur von Haltepotentialen negativer als -50 mV aus aktivierbar. Der HVA- Ca^{2+} -Strom dagegen inaktiviert sehr viel langsamer, aktiviert bei -20 mV Membranpotential und ist weniger haltepotentialabhängig als der LVA- Ca^{2+} -Strom (Carbone und Lux, 1987a) (Abb.1). Diese beiden Kanaltypen konnten auch in Einzelkanalableitungen bezüglich ihrer Leitfähigkeit und Offenzeit unterschieden werden (Carbone und

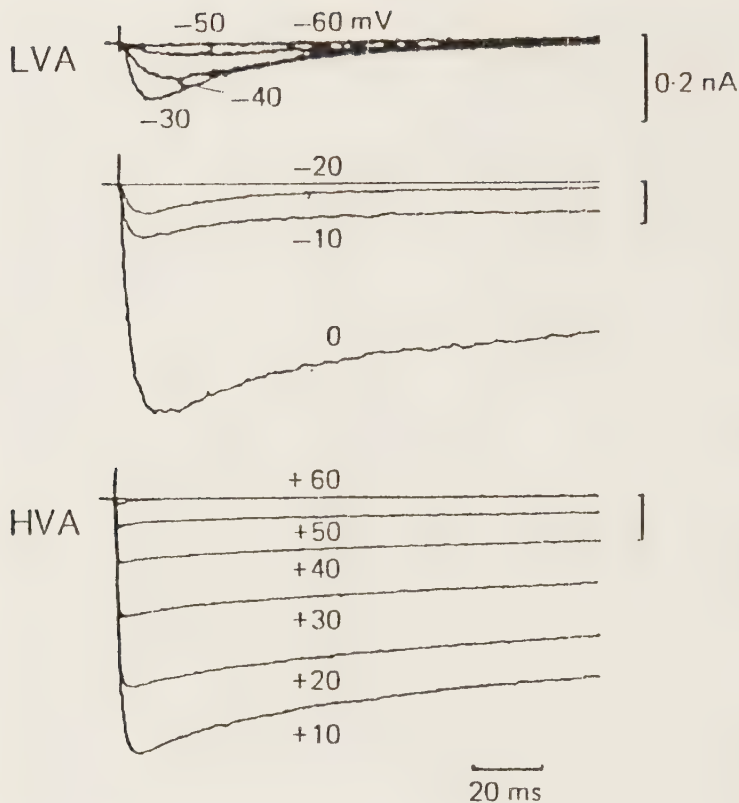


Abb. 1: Ca^{2+} -Stromtypen in differenzierten DRG-Neuronen (E10).

Messung der Ca^{2+} -Ströme eines differenzierten DRG-Neurons des Hühnchenembryos mit Hilfe der Ganzzellaufnahme der patch-clamp-Technik. Die Zelle wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV zu den jeweils angegebenen Membranpotentialen hin depolarisiert.

Zwischen -60 und -50 mV Membranpotential aktiviert der "low-voltage-activated (LVA)" Ca^{2+} -Strom, der bei -30 mV Membranpotential innerhalb von 100 ms vollständig inaktiviert. Bei Membranpotentialen positiver als -20 mV aktiviert der "high-voltage-activated (HVA)" Ca^{2+} -Strom, der sehr viel langsamer als der LVA- Ca^{2+} -Strom inaktiviert und daher für die nach 100 ms persistierende Komponente des Ca^{2+} -Stroms verantwortlich ist. Bei Membranpotentialen positiver als 0 mV dominiert der HVA- Ca^{2+} -Strom (aus Carbone und Lux, 1987a).

Lux, 1984b, 1987b). Aufgrund des stark unterschiedlichen Inaktivierungsverhaltens der beiden Typen von Ca^{2+} -Strömen können bei einem Membranpotential, bei dem beide Typen aktivieren (-10 mV), die relativen Proportionen dieser beiden Ströme bestimmt werden. Der LVA- Ca^{2+} -Stromanteil ergibt sich dabei aus der in 100-200 ms inaktivierenden Komponente des Ca^{2+} -Stroms, der HVA- Ca^{2+} -Stromanteil aus der nach 100-200 ms persistierenden Komponente des Ca^{2+} -Stroms (Carbone und Lux, 1986a).

Nach einer schnellen extrazellulären pH-Änderung werden in DRG-Neuronen transiente Na^+ -Ströme aktiviert (Konnerth et al., 1987; Davies et al., 1988). Der pH-induzierte Na^+ -Strom inaktiviert mit einer Zeitkonstanten von 300 ms und ist durch Ca^{2+} -Kanalblocker blockierbar. Während des pH-induzierten Na^+ -Stroms ist kein durch Depolarisation auslösbarer Ca^{2+} -Strom meßbar. Dies spricht dafür, daß durch Änderung des extrazellulären pH Ca^{2+} -Kanäle so transformiert werden, daß sie Na^+ leitend werden. Der pH-induzierte Na^+ -Strom könnte daher eine zusätzliche Möglichkeit bieten, Ca^{2+} -Kanäle nachzuweisen.

Dieselbe Technik wie bei der Isolierung undifferenzierter neuronaler DRG-Vorläuferzellen (Rohrer et al., 1985) kann auch in einem weiteren peripheren Hühnchenganglion, dem Ciliarganglion, angewendet werden (Rohrer und Thoenen, 1987). Dies ermöglicht es, das zeitliche Auftreten von Einwärtsströmen in zwei verschiedenen Zelltypen zu verfolgen und zu vergleichen. Aus sympathischen Ganglien können dagegen auf diese Weise keine neuronalen Vorläuferzellen isoliert werden (Rohrer und Thoenen, 1987). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb zunächst der genaue Zeitverlauf der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in DRG-Vorläuferzellen in der Größenordnung von Stunden bestimmt und mit dem Zeitverlauf des Auftretens von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in Ciliarvorläuferzellen verglichen.

5. Embryonale Blutegelneurone als Modellsystem für neuronale Differenzierung in Invertebraten

Die Untersuchung der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in embryonalen Invertebratenneuronen bietet die Möglichkeit, festzustellen, inwieweit die wesentlichen Grundzüge des Auftretens von Ionenströmen auch bei phylogenetisch niederen Organismen konserviert sind. Als Modellsystem bietet sich dazu der medizinische Blutegel an, da er ein relativ einfaches Nervensystem besitzt, dessen adulte Eigenschaften intensiv untersucht worden sind (Muller et al., 1981).

Das Zentralnervensystem von *Hirudo medicinalis* ist aufgebaut aus einer Kette von segmental sich wiederholenden Ganglien. Am Kopf- und Schwanzende sind mehrere Ganglien zu einem Kopf- bzw. Schwanzganglion fusioniert (Muller et al., 1981). Jedes dieser segmentalen Ganglien enthält ungefähr 400 Neurone, die im adulten Tier auf dem Niveau von Einzelzellen identifiziert werden können. Die verschiedenen Typen von Neuronen können aufgrund ihrer Größe, ihrer Lage im Ganglion, des Verzweigungsmusters ihrer Neurite, ihres Transmittergehaltes und von zelltypspezifischen Antigenen erkannt werden. So ist es zum Beispiel möglich, die medial gelegenen Retzius-Zellen allein aufgrund ihrer enormen Größe zu identifizieren (Abb. 2). Den verschiedenen Typen von sensorischen Neuronen und den Retzius-Zellen kann eine charakteristische Form des Aktionspotentials zugeordnet werden (Nicholls und Baylor, 1968). In diesen Zelltypen werden Aktionspotentiale auch über der somatischen Membran erzeugt; in den Motoneuronen jedoch sind keine somatischen Aktionspotentiale nachweisbar (Muller et al., 1981).

Da jedes Ganglion nur wenige Zellen eines bestimmten Typs enthält, ist es möglich, die morphologische Entwicklung einzelner Zellen *in vivo* zu verfolgen. So können in embryonalen Ganglien die differenzierenden Retzius-Zellen aufgrund ihres Serotonin- oder Dopamingehaltes einschließlich ihrer Neurite dargestellt werden (Glover und Mason, 1986; Dietzel und Gottmann, 1988). Auf diese Weise ist es möglich, den morphologischen Differenzierungszustand mit der

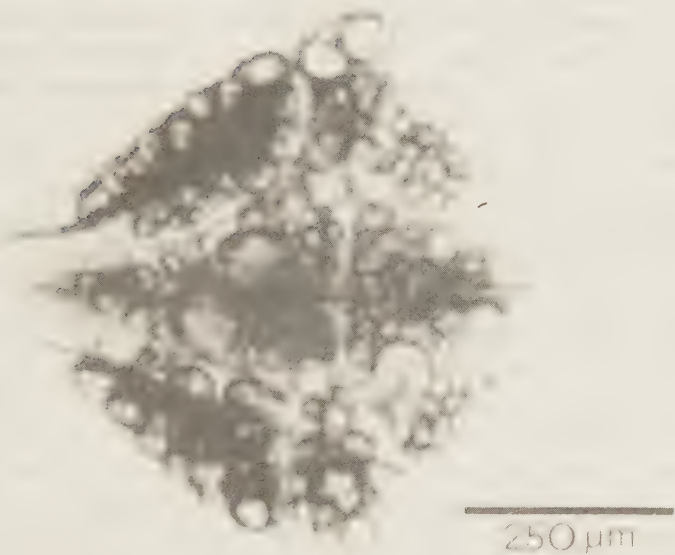


Abb.2: Adultes, segmentales Blutegelganglion.

Die in den segmental sich wiederholenden Ganglien des Blutegels *Hirudo medicinalis* enthaltenen Neurone können auf dem Niveau von Einzelzellen identifiziert werden. Im Zentrum des Ganglions z.B. sind deutlich zwei Zellen erkennbar, die sich allein durch ihre enorme Größe von allen anderen Zellen unterscheiden: die Retzius-Zellen (aus Nicholls und Baylor, 1968).

Expression von spannungsabhängigen Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen zu korrelieren.

Der Blutegelembryo enthält in frühen Stadien proliferierende Stammzellen, die Teloblasten. Jeder dieser Teloblasten erzeugt durch fortgesetzte Teilungen ein Band von Tochterzellen; die Bänder von insgesamt 10 Teloblasten vereinigen sich zur Germinalplatte. Die embryonalen Ganglien bilden sich aus Zellen der Germinalplatte, wobei die Ganglien zunächst im anterioren Bereich des Embryo sichtbar werden, während am posterioren Ende die Teloblasten noch undifferenzierte Tochterzellen abschnüren (Fernandez und Stent, 1982; Weisblat, 1985).

B. Fragestellung

Nervenzellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie elektrisch erregbar sind. Für die Entstehung eines Aktionspotentials über der Nervenzellmembran sind spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme, die durch membranintegrierte Na^+ - und Ca^{2+} -selektive Kanäle zustandekommen, von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde das erste Auftreten spannungsabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme in differenzierenden embryonalen Neuronen untersucht. Dabei wurden folgende Fragestellungen besonders berücksichtigt:

1.) In welcher zeitlichen Relation zu anderen, entscheidenden Ereignissen (terminale Mitose, Beginn des Neuritenwachstums) der neuronalen Differenzierung erfolgt das erste Auftreten spannungsabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme?

i.) Durch Komplement-vermittelte Lyse differenzierter Neurone können neuronale DRG-Vorläuferzellen isoliert werden, die die terminale Mitose bereits durchlaufen haben und für die der Zeitpunkt der terminalen DNS-Synthesephase bekannt ist (Rohrer und Thoenen, 1987). Diese DRG-Vorläuferzellen sind zunächst noch undifferenziert und erlangen neuronale Eigenschaften (neuronen-spezifische Q211-Antigene, spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme) im Verlauf der nächsten 24 Stunden in Kultur (Rohrer et al., 1985). Im Gegensatz dazu besitzen proliferierende sympathische Neurone bereits vor der terminalen Mitose das neuronen-spezifische Q211-Antigen (Rohrer und Thoenen, 1987). Die zeitliche Relation der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen zur terminalen Mitose wurde in diesen beiden Zelltypen untersucht.

ii.) Die segmentalen Ganglien von *Hirudo medicinalis* enthalten jeweils nur sehr wenige Neurone eines bestimmten Zelltyps (z.B. nur zwei Retzius-Zellen pro Ganglion). Dies ermöglicht es, durch selektive histologische Darstellung eines Zelltyps die morphologische Differenzierung identifizierter Zellen, insbesondere das Auswachsen von

Neuriten, zu verfolgen und die morphologische Differenzierung zeitlich mit der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen zu korrelieren.

Die Kenntnis der zeitlichen Relation der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen zur terminalen Mitose und zum Beginn des Neuritenwachstums erlaubt es abzuschätzen, ob Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle früh genug exprimiert werden, um eine wesentliche Rolle in neuronalen Differenzierungsprozessen spielen zu können.

2.) In welchem zeitlichen Abstand zueinander werden Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme exprimiert?

Untersuchungen der Ionenabhängigkeit des Aktionspotentials an embryonalen Amphibienneuronen (Spitzer, 1983) schienen darauf hinzudeuten, daß embryonale Neurone zunächst hauptsächlich eine Ca^{2+} -Leitfähigkeit besitzen, während die Na^+ -Leitfähigkeit der Membran erst später ausgebildet wird. Messungen der Ionenströme unter voltage-clamp-Bedingungen jedoch zeigten, daß auch in embryonalen Neuronen, deren Aktionspotential überwiegend Ca^{2+} -abhängig ist, sowohl Ca^{2+} - als auch Na^+ -Ströme bereits nachweisbar sind (O'Dowd et al., 1988).

An differenzierenden Neuralleistenzellen (Bader et al., 1983) und an differenzierenden DRG-Vorläuferzellen (Rohrer et al., 1985) konnte gezeigt werden, daß Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme in einem Zeitraum von weniger als einem Tag auftreten. Darüberhinaus wurde in Rohrer et al., 1985 beschrieben, daß die LVA- Ca^{2+} -Ströme vor den HVA- Ca^{2+} -Strömen auftreten. Eine weitere Möglichkeit die allgemeine Gültigkeit dieser Befunde zu untersuchen, bieten in Kultur differenzierende Ciliar-vorläuferzellen, die auf analoge Weise wie DRG-Vorläuferzellen isoliert und kultiviert werden können (Rohrer und Thoenen, 1987). Um weiterhin festzustellen, ob auch in phylogenetisch niederen Organismen Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme innerhalb eines kurzen Zeitraums und verschiedene Typen von Ca^{2+} -Strömen nacheinander exprimiert werden, wurden

embryonale Blutegelneurone aus verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht.

3.) Besitzen Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme kurz nach Beginn ihrer Expression andere Eigenschaften als in differenzierten Neuronen und sind bereits bei embryonalen Zellen speziesspezifische Unterschiede nachweisbar?

Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme könnten zu Beginn ihrer Expression eine andere molekulare Struktur besitzen, als in differenzierten Neuronen. Dies würde sich dann in veränderten Eigenschaften der frühen Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme niederschlagen. Daher wurden die Kinetik, die Spannungsabhängigkeit und die pharmakologischen Eigenschaften von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in differenzierenden Hühnchen- und Blutegelneuronen kurz nach Beginn ihrer Expression untersucht und mit den Eigenschaften von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in differenzierten Neuronen verglichen. Dies erlaubt auch eine Aussage darüber, ob speziesspezifische Unterschiede zwischen Hühnchen- und Blutegelneuronen bereits bei embryonalen Zellen vorhanden sind.

4.) Lassen sich zelltypspezifische Unterschiede innerhalb einer Spezies bereits zu Beginn der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen nachweisen?

DRG-Vorläuferzellen und Ciliarvorläuferzellen können unter vergleichbaren Bedingungen isoliert und kultiviert werden. Dies ermöglicht es, zu untersuchen, ob diese verschiedenen Zelltypen (sensorische bzw. parasympathische Neurone) bereits zu Beginn der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen unterschiedliche Differenzierungswege aufweisen oder zunächst ein gemeinsames Stadium eines unreifen Neurons durchlaufen. Dazu wurden der exakte Zeitverlauf der Expression und die relativen Proportionen von Na^+ -, LVA- Ca^{2+} - und HVA- Ca^{2+} -Strömen in beiden Zelltypen bestimmt und miteinander verglichen.

C. Materialien und Methoden

1. Zellkulturen

Zellkulturen von Hühnchenneuronen bzw. neuronalen Vorläuferzellen wurden von H.Rohrer, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Martinsried zur Verfügung gestellt.

1.1. Isolierung und Kultivierung neuronaler Vorläuferzellen aus dem Hinterwurzel- und Ciliarganglion des Hühnchenembryos

Hinterwurzelganglien wurden aus 6 Tage alten Hühnchenembryonen entnommen. Um eine Verunreinigung mit sympathischen Ganglien zu vermeiden, wurden nur Hinterwurzelganglien aus dem lumbosakralen Bereich verwendet und das ventral von den Hinterwurzelganglien gelegene Gewebe wurde sorgfältig abgetrennt. Ciliarganglien wurden aus 4.5 Tage alten Hühnchenembryonen entnommen.

Die Ganglien wurden zunächst in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), die 1 mg/ml Glukose enthielt, gesammelt und dann für 6 (DRG) bzw. 10 Minuten (Ciliarganglien) mit 0.1% Trypsinlösung behandelt. Die enzymatische Behandlung wurde durch Zugabe von Soybean-Trypsininhibitor (0.1%) gestoppt. Danach wurden die Ganglien zunächst in Hams F14-Medium, das 10% Pferdeserum und 5% foetales Kälberserum enthielt, und dann zweimal in F14-Medium, das 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) enthielt, gewaschen. Anschließend wurden die Ganglien mechanisch zu Einzelzellen dissoziiert.

Um die in den Hinterwurzelganglien enthaltenen differenzierten Neurone und Gliazellen zu lysieren, wurde die Zellsuspension für 40 min bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre, die 5% CO₂/95% Luft enthielt, mit dem glia-spezifischen Antikörper O4 (1:40) und dem neuronenspezifischen Antikörper Q211 (Rösner et al., 1985) (1:1000) in Anwesenheit von agarosebehandeltem Meerschweinchenkomplement (1:6) (Cohen und Schlesinger, 1970) inkubiert (Rohrer et al., 1985). Danach wurden die überlebenden Zellen

durch Zentrifugation konzentriert und in F14-Medium resuspendiert. Um die aufgrund der Lyse der differenzierten Zellen entstandenen Zellreste abzutrennen, wurde die Zellsuspension vorsichtig auf eine 3%BSA/F14-Lösung aufgebracht und für 25 min bei 60g zentrifugiert (Ernsberger et al., 1988). Dies erlaubte eine fast vollständige Trennung lysierter und nicht-lysierter Zellen. Anschließend wurden die Zellen im Kulturmedium (F14/10% Pferdeserum/5% foetales Kälberserum) resuspendiert und auf Polyornithin (0.5 mg/ml) beschichtete Kulturschalen aufgebracht, die zuvor für wenigstens 2 Stunden mit Maus-Sarkomalaminin (10 ug/ml) inkubiert worden waren (Edgar et al., 1981). Zusätzlich waren in den Kulturen von DRG- und Ciliarvorläuferzellen als Überlebensfaktoren Nervenwachstumsfaktor (NGF, 20 ng/ml) bzw. "ciliary neuronotrophic factor" (CNTF, 10 ng/ml) vorhanden. NGF wurde nach Suda et al., 1978; CNTF nach Manthorpe et al., 1986 hergestellt.

Da Ciliarvorläuferzellen in der Anwesenheit von Gliazellen besser überlebten, wurden zur Herstellung dieser Kulturen nur die differenzierten Neurone abgetötet. Da jedoch die Entwicklung der Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme bei DRG-Vorläuferzellen unabhängig vom Vorhandensein ausdifferenzierter Gliazellen war (siehe D 3.1.), können die Kulturbedingungen trotzdem als vergleichbar angesehen werden.

Neuronale Vorläuferzellen in Kultur konnten aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie von Gliazellen eindeutig unterschieden werden. Abb. 3 zeigt die typische Morphologie neuronaler Vorläuferzellen in den ersten Stunden in Kultur, die im Verlauf von 20-30 Stunden eine typische neuronale Morphologie entwickelten.

1.2. Kultivierung von proliferierenden sympathischen Neuronen und differenzierten Ciliarneuronen aus Hühnchenembryonen

Sympathische Ganglien wurden aus dem lumbosakralen Bereich von 7 Tage alten und Ciliarganglien aus 8 Tage alten Hühnchenembryonen entnommen. Zu diesem Zeitpunkt besitzen

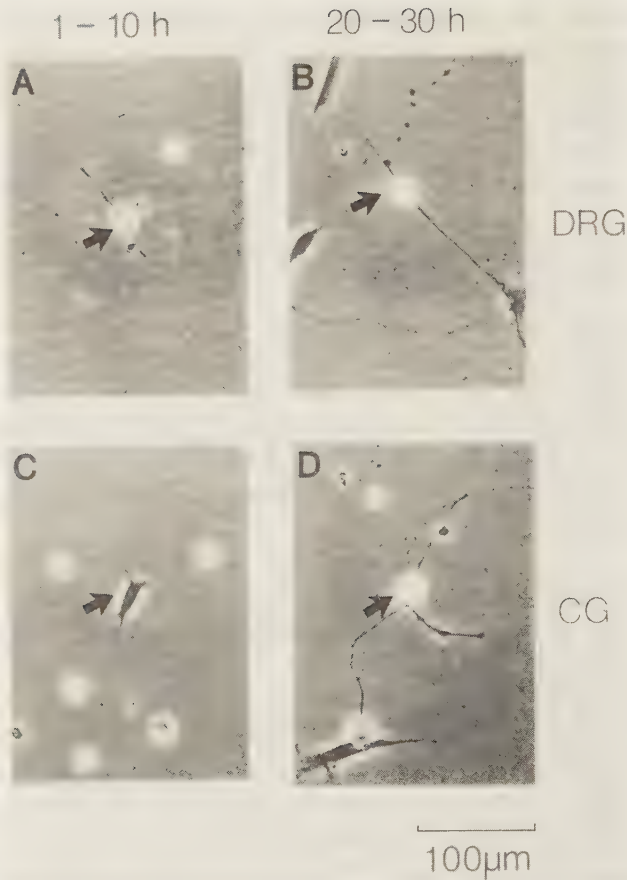


Abb. 3: Isolierte neuronale Vorläuferzellen in Kultur.

Isolierte neuronale Vorläuferzellen aus dem Hinterwurzelganglion (DRG) und aus dem Ciliarganglion (CG) des Hühnchenembryos können in Kultur aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie von Gliazellen unterschieden werden.

DRG-Vorläuferzellen zeigen bereits in den ersten 10 Stunden in Kultur eine typische neuronale Morphologie (A), während CG-Vorläuferzellen zunächst einen phasendunklen Zellkörper mit nur kurzen Fortsätzen besitzen (C). Nach 20-30 Stunden in Kultur sind sowohl DRG- als auch CG-Vorläuferzellen morphologisch zu Neuronen ausdifferenziert (B,D).

bereits alle Neurone in den Ciliarganglien das neuronenspezifische Q211-Antigen und können daher als differenzierte Neurone betrachtet werden (Rohrer und Thoenen, 1987). Die Ganglien wurden wie in 1.1. beschrieben mit Trypsin behandelt und mechanisch zu Einzelzellen dissoziiert. Anschließend wurden sie im gleichen Medium und auf dem gleichen Substrat wie in 1.1. kultiviert. Kulturen sympathischer Neurone enthielten NGF (20 ng/ml), wogegen Kulturen von differenzierten Ciliarneuronen keine Überlebensfaktoren enthielten, da die Neurone nur innerhalb der ersten 3 Stunden in Kultur auf Ionenströme untersucht wurden.

Abb. 4A zeigt die Morphologie typischer E8-Ciliarneurone, die kurz nach der Dissoziation nur sehr kurze Neurite aufweisen. E7-sympathische Neurone sind zum Großteil noch in der Lage sich zu teilen, sodaß in solchen Kulturen häufig Zellpaare beobachtet werden können (Abb. 4B), die entweder gerade die Mitose durchlaufen (Rohrer und Thoenen, 1987) oder sie vor kurzem durchlaufen haben.

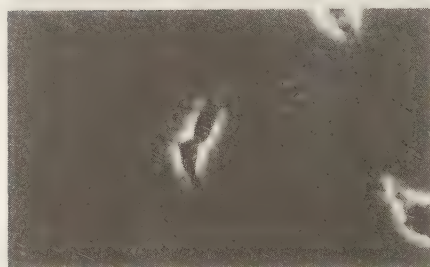
1.3. Kultivierung embryonaler Blutegelneurone

Um eine möglichst einheitliche Zellpopulation zu erhalten, wurden nur embryonale Blutegelneurone aus den segmentalen Ganglien untersucht, da sich die im Kopf- bzw. Schwanzganglion enthaltenen Neurone in ihrer morphologischen Entwicklung von Neuronen gleichen Zelltyps in den segmentalen Ganglien unterscheiden können (Dietzel und Gottmann, 1988). Dazu wurden die segmentalen Ganglien aus Blutegelembryonen zwischen dem 7. und 11. Embryonaltag (siehe D 4.1.) isoliert und anschließend für 1 Stunde in Kollagenase/Dispase (2ml Leibowitz 15-Medium (L15) + 2% foetales Kälberserum (FCS) + 200 ul Kollagenase-Dispase-Lösung (100 mg Kollagenase/Dispase in 4.5 ml L15+2%FCS)) (Dietzel et al., 1986) inkubiert. Danach wurden die Ganglien in L15+2%FCS gewaschen und mit Hilfe einer Mikropipette (Spitzendurchmesser: 80-100 µm) in L15+2%FCS steril zu Einzelzellen dissoziiert.

A



B



100µm

Abb. 4:

A: Frisch isoliertes Ciliarneuron in Kultur.

Am 8. Embryonaltag aus Hühnchenembryonen isolierte, differenzierte Ciliarneurone zeigen kurz nach der Dissoziationsprozedur vergleichbar kurze Neurite wie Ciliarvorläuferzellen in den ersten Stunden in Kultur (siehe Abb. 3C).

B: Proliferierende, sympathische Neurone in Kultur.

Am 7. Embryonaltag aus Hühnchenembryonen isolierte sympathische Neurone sind zum Großteil noch in der Lage, sich zu teilen. In solchen Kulturen finden sich daher häufig Zellpaare, die entweder gerade die Mitose durchlaufen oder sie vor kurzem durchlaufen haben.

Zur Untersuchung von Ionenströmen wurden die Zellen in serumfreiem L15 auf Poly-L-Lysin-beschichtete (1 mg/ml) Kulturschalen aufgebracht. Nach 0.5-1 Stunde waren die Zellen ausreichend am Substrat angehaftet und wurden auf Ionenströme hin untersucht.

Um die Lebensfähigkeit dissoziierter embryonaler Blutegelneurone zu untersuchen, wurden die Zellen auf Concanavalin A- beschichtete Kulturschalen (2 mg/ml) (auf Concanavalin A zeigen lebensfähige Blutegelneurone ein starkes Auswachsen von Neuriten (Chiquet und Acklin, 1986)) aufgebracht und in L15 + 2%FCS + Glukose (6mg/ml) + Gentamycin (0.1mg/ml) (Ready und Nicholls, 1979) über mehrere Tage hin kultiviert.

2. Messung von Ionenströmen mit Hilfe der Ganzzellableitung der patch-clamp-Technik

2.1. Allgemeines zur Ganzzellableitung

Spannungsabhängige Ionenströme durch die Zellmembran sind in ihren Eigenschaften wie Aktivierung und Kinetik abhängig vom Membranpotential. Für die Untersuchung der Eigenschaften solcher Ionenströme ist es daher notwendig, das Membranpotential während der Messung auf einem konstanten Wert zu halten. Durch die Zellmembran fließende Ionenströme bedingen jedoch ein verändertes Membranpotential. Um einen konstanten Wert des Membranpotentials zu erhalten, muß daher, um die Ionenströme durch die Membran zu kompensieren, ein gleich großer Strom mit umgekehrtem Vorzeichen in die Zelle injiziert werden. Der zur Konstanthaltung des Membranpotentials nötige Strom entspricht dem Membranstrom sowohl in der Amplitude als auch im zeitlichen Verlauf und die Registrierung dieses Stroms erlaubt daher die Messung von Ionenströmen durch die Membran.

In der klassischen voltage-clamp-Technik werden dazu zwei Glasmikroelektroden in die Zelle eingestochen. Eine Elektrode dient zur Messung des Membranpotentials, während

über die andere Elektrode der zur Kompensation des Membranstroms nötige Strom injiziert wird. Es kann nun ein bestimmtes Membranpotential vorgegeben werden (Haltepotential) und die Zelle kann kontrolliert zu einem bestimmten Membranpotential hin depolarisiert werden.

Bei der Ganzzellaufleitung der patch-clamp-Technik (Hamill et al, 1981; Marty und Neher, 1983) dagegen, ist zur Messung von Ionenströmen nur eine Elektrode notwendig. Diese Elektrode (Patchpipette) mit einem Spitzendurchmesser von 1-2 μm wird bei der patch-clamp-Technik zunächst auf die Zellmembran aufgesetzt und dann wird durch Anlegen eines Unterdrucks ein Teil der Membran in die Patchpipette eingesaugt. Dies ist mit der Ausbildung eines "Gigaseals" verbunden, d.h. der elektrische Widerstand der Patchpipette erreicht Werte im Gigaohmbereich, sodaß zwischen Glas und Membran praktisch kein Leckstrom mehr fließen kann. Bei der Ganzzellaufleitung wird nun das Membranstück ("patch") in der Pipette durch weiteren Unterdruck zerstört. Dies führt zu einer im Vergleich zu Mikroelektroden niederohmigen Verbindung (kleiner 20 M Ω) mit dem Zellinneren, wobei das Gigaseal zwischen Glasrand und Membran erhalten bleibt (Abb. 5A).

Das Membranpotential kann nun mit Hilfe eines Strom-Spannungswandlers kontrolliert werden (Abb. 5B). Die Funktion eines solchen Strom-Spannungswandlers beruht darauf, daß das Potential am (-)-Eingang auf dem gleichen Wert, als am (+)-Eingang durch die "command voltage" vorgegeben, gehalten wird. Ist der in Serie zum Membranwiderstand R_m liegende Widerstand R_s (Widerstand der Patchpipette und cytoplasmatischer Widerstand) sehr viel kleiner als der Membranwiderstand, so kann der Spannungsabfall über dem Serienwiderstand vernachlässigt werden. Das Potential im Zellinneren entspricht dann dem Potential am (-)-Eingang des Strom-Spannungswandlers und damit der "command voltage". Die Zelle kann daher auf einem bestimmten Membranpotential gehalten (Haltepotential) und kontrolliert zu bestimmten Membranpotentialen hin depolarisiert werden.

A



B

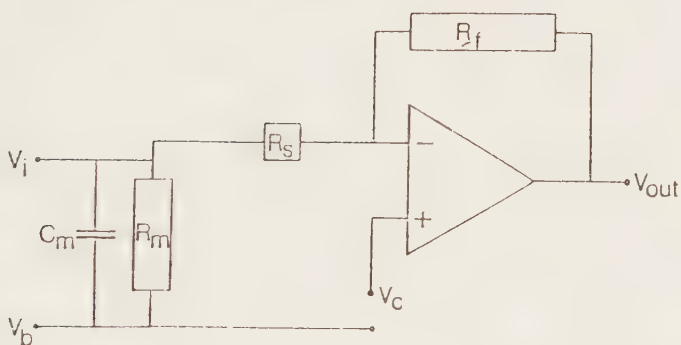


Abb. 5:

A: Ganzzellaableitung der patch-clamp-Technik.

Nach Aufsetzen der Patchpipette auf die Zellmembran und Ausbildung eines Gigaseals, wird das Membranstück unter der Patchpipette zerstört, sodaß eine niederohmige Verbindung zum Zellinneren entsteht, die gleichzeitig eine Kontrolle des intrazellulären Milieus erlaubt.

B: Vereinfachtes Ersatzschaltbild der Ganzzellaableitung.

V_i : intrazelluläres Potential; V_b : extrazelluläres Potential; V_c : "command voltage"; V_{out} : dem Membranstrom proportionale Spannung am Ausgang des Strom-Spannungswandlers; R_f : Rückkopplungswiderstand; R_s : Serienwiderstand; R_m : Membranwiderstand; C_m : Membrankapazität.

Führt eine solche Depolarisation zur Öffnung von Ionenkanälen und damit zu einem Ionenstrom, so muß dieser Strom, wenn das Potential am (-)-Eingang des Strom-Spannungswandlers auf dem Wert der "command voltage" bleiben soll, über den Rückkopplungswiderstand R_f abfließen. Der Strom-Spannungswandler erzeugt daher an seinem Ausgang eine dem Membranstrom proportionale Spannung, deren Registrierung die Messung der Membranströme erlaubt. Ist nun auch während des Fließens des maximalen Membranstroms der Spannungsabfall über dem Serienwiderstand klein (kleiner 3 mV; was für Zellen kleiner 30 μm in der Regel erfüllt ist), so kann wiederum der Spannungsabfall über dem Serienwiderstand vernachlässigt werden und das Membranpotential als konstant und der "command voltage" gleich angesehen werden. Es können daher die spannungsabhängigen Ionenströme unter kontrollierten Membranpotentialbedingungen untersucht werden.

Zusätzlich kann bei der Ganzzellaufleitung auch das intrazelluläre Milieu kontrolliert werden. Das intrazelluläre Milieu entspricht aufgrund des im Vergleich zu Mikroelektroden relativ großen Spitzendurchmessers der Patchpipette bereits nach wenigen Minuten Äquilibration der in der Patchpipette enthaltenen Lösung.

2.2. Ableitbedingungen

Patchpipetten wurden aus dickwandigem Duranglas in zwei Schritten gezogen ("Mecanex"-Puller) und am gleichen Tag verwendet. Der Widerstand der Patchpipetten betrug nach der Füllung mit den in Tabelle 1 angegebenen intrazellulären Lösungen 5-10 M Ω . Der Rückkopplungswiderstand R_f betrug 1 G Ω . Als Strom-Spannungswandler diente ein OPA 111 BM Operationsverstärker.

Die Ableitungen wurden bei 20-22°C mit Hilfe eines invertierenden Mikroskops vorgenommen. Um die Entstehung eines Gigaseals verfolgen zu können, wurde die Patchpipette in regelmäßigen Abständen um 2 mV gegenüber dem Bad depolarisiert und der dabei fließende Strom beobachtet. Die

Patchpipetten wurden zunächst unter Überdruck, sodaß die in der Pipette enthaltene Lösung ausströmte und eine Verunreinigung der Pipettenspitze vermieden wurde, auf die Zellmembran aufgesetzt. Der Überdruck wurde daraufhin entfernt, was häufig bereits zur Ausbildung eines Gigaseals führte. Sofern ein Gigaseal noch nicht entstanden war, konnte es durch Unterdruck in der Patchpipette erzeugt werden. Nach Ausbildung eines Gigaseals wurden die kapazitiven Transienten, die durch Umladung der vorhandenen Kapazität (bedingt durch den 2 mV Spannungssprung) entstehen, analog minimiert und dann die Zelle durch erneuten Unterdruck in der Patchpipette geöffnet, was an einer plötzlichen Zunahme der kapazitiven Transienten, bedingt durch die plötzliche Zunahme der Kapazität beim Öffnen der Zelle (Hamill et al., 1981), beobachtbar war. Nach einigen Minuten war die cytoplasmatische Lösung ausreichend gegen die Lösung in der Patchpipette ausgetauscht, sodaß die K^+ -Auswärtsströme, aufgrund der K^+ -freien Pipettenlösung, blockiert waren und Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme isoliert gemessen werden konnten. Ionenströme ab einer Mindestamplitude von 5 pA konnten eindeutig nachgewiesen werden.

Die Daten wurden on-line mit Hilfe eines LSI 11/73 Computers digitalisiert. Hyperpolarisierende Spannungspulse führen zu kapazitiven Transienten und Leckströmen mit umgekehrtem Vorzeichen wie depolarisierende Spannungspulse, jedoch erzeugen sie keine durch Öffnung von Ionenkanälen bedingten Ströme. Die auf Depolarisation der Membran hin erhaltenen Antworten der Zelle konnten daher mit den gemittelten Antworten auf hyperpolarisierende Pulse korrigiert werden, sodaß kapazitive Transienten in den Messungen minimiert und Leckströme ausgeschlossen werden konnten.

2.3. Extra- und intrazelluläre Lösungen

In Tabelle 1 sind die verwendeten intra- und extra-zellulären Lösungen aufgeführt. Die intrazellulären Lösungen

Tabelle 1

Extrazelluläre Lösungen:

CaCl ₂	NaCl	Cholin-Cl	TEA-Cl	4-AP	Glucose	Pipes	Hepes	MgCl ₂	CdCl ₂	TTX	pH
Hühnchen:											
5Ca ²⁺ :	-	120	10	2	5	-	10	2	-	3x10 ⁻³	7.3
120Na ⁺ :	120	-	10	2	-	-	10	6	0.5	-	7.3
Hühnchen											
(pH-Strome):											
40Na ⁺ , 5Ca ²⁺	40	80	10	2	-	-	20	2	-	-	7.9
40Na ⁺ , 5Ca ²⁺	40	80	10	2	-	20	-	2	-	-	6.0
130Na ⁺	130	-	10	2	-	-	20	2	-	-	7.9
130Na ⁺	130	-	10	2	-	20	-	2	-	-	6.0
10Ca ²⁺ :	-	110	10	2	-	-	20	2	-	-	7.9
Blutegel:											
5Ca ²⁺ :	-	120	10	2	-	-	10	2	-	-	7.3
50Ca ²⁺ :	-	50	10	2	-	-	10	2	-	-	7.3
120Na ⁺ :	120	-	10	2	-	-	10	6	0.5	-	7.3

Intrazelluläre Lösungen:

N-Methyl-D-Glucamin	NaCl	TEA-Cl	CaCl ₂ ⁺	EGTA	Glucose	Hepes	MgCl ₂ ⁺	ATP	cAMP	pH
Hühnchen:	-	20	0.25	5	10	10	5	2	0.1	7.3
Hühnchen										
(pH-Strome):	100	20	0.25	5	10	20	5	2	0.1	7.3
Blutegel:	-	20	-	10	-	10	5	2	0.1	7.3

enthielten statt K^+ N-Methyl-D-Glucamin, um K^+ -Auswärtsströme zu blockieren. Um den durch die Perfusion des Zellinneren bedingten run-down der Ca^{2+} -Ströme soweit wie möglich zu reduzieren, enthielten sie cAMP, ATP und Mg^{2+} (siehe D 1.1.). Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde mit EGTA, um eine Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung von Ca^{2+} -Strömen zu verhindern, und der pH mit HEPES bzw. PIPES gepuffert. Die extrazellulären Lösungen enthielten TEA und 4-AP, um K^+ -Auswärtsströme zu blockieren. Bei der Isolierung von Na^+ -Strömen wurden zusätzlich Ca^{2+} -freie und Cd^{2+} -haltige, bei der Isolierung von Ca^{2+} -Strömen Na^+ -freie und im Falle von Hühnchenneuronen TTX-haltige extrazelluläre Lösungen verwendet.

In einigen Experimenten wurde in der extrazellulären Standardlösung NaCl durch Cholinchlorid ersetzt bzw. es wurde zur extrazellulären Lösung TTX, $CdCl_2$ oder Verapamil zugesetzt.

Die extrazellulären Lösungen wurden durch hydrostatischen Druck mit Hilfe einer 50-100 μm von der Zelle entfernten Perfusionspipette mit mehreren Zuläufen appliziert, die es erlaubte, die extrazelluläre Lösung um die untersuchte Zelle rasch und vollständig auszutauschen (Carbone und Lux, 1987). Um schnelle extrazelluläre pH-Änderungen zu erzeugen, wurden Perfusionspipetten mit möglichst geringem Totraum verwendet und die verschiedenen Lösungen wurden mit Hilfe automatisch gesteuerter, durch Druckluft geöffneter Ventile appliziert (Davies et al., 1988).

3. Histologische Darstellung embryonaler Blutegele neurone

Embryonale Retzius-Zellen können nach Präinkubation in Dopamin einschließlich ihrer Neurite histologisch dargestellt werden (Dietzel und Gottmann, 1988). Dazu wurden intakte Blutegelembryonen für mindestens 3 Stunden in Dopamin inkubiert. Die Inkubationslösung wurde jeweils frisch angesetzt und enthielt 50 mM Dopamin und 0.5 M Ascorbat

(erhöht die Stabilität des Dopamins) bei $\text{pH}=7.4$. 100 μl dieser Lösung wurden zu 2 ml "Quellwasser" (2.8g NaCl, 0.05g KCl, 0.08g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.025g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.56g Tris ($\text{pH}=7.4$) pro Liter wurden 1:100 mit deionisiertem H_2O verdünnt), in dem die Embryonen enthalten waren, zugesetzt.

Die dopaminhaltigen Neurone wurden dann mit Hilfe der Glyoxylsäuretechnik (de la Torre und Surgeon, 1976) angefärbt. Das frisch präparierte Gewebe wurde dazu für 2 Minuten in SPG-Lösung (230 mM Saccharose, 270 mM KH_2PO_4 , 100 mM Glyoxylsäure, $\text{pH}=7.4$ mit 1n NaOH) inkubiert und danach luftgetrocknet. Nach Bedecken des Präparates mit Immersionsöl, wurde es für 5 Minuten bei 80°C inkubiert. Die glyoxylsäure-induzierte Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Zeiss Fluoreszenzmikroskops (Filter: BP 400-440 oder 436, FT 460, LP 470 oder BP 390-420, FT 425, LP 450) betrachtet.

Es wurden sowohl Präparate intakter Germinalplatten als auch daraus isolierter Ganglien hergestellt. In Präparaten isolierter Ganglien waren die Zellkörper und Neurite deutlicher zu sehen, während in intakten Germinalplatten vor allem in die Peripherie auswachsende Neurite beobachtet werden konnten.

D. Ergebnisse

1. Expression spannungsabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme in neuronalen Vorläuferzellen aus dem Hinterwurzelganglion

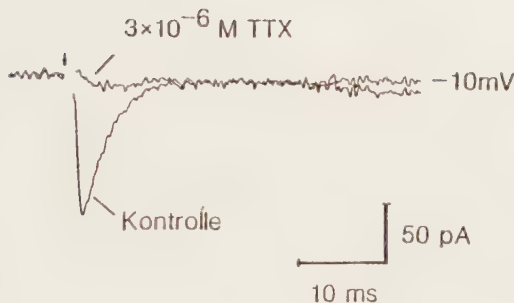
Differenzierte Neurone und Gliazellen aus dem Hinterwurzelganglion des Hühnchenembryos können nach Inkubation mit neuron- und gliaspezifischen Antikörpern und anschließender Komplementzugabe lysiert werden. Dieses Vorgehen ermöglicht es, am 6. Embryonaltag aus embryonalen Hinterwurzelganglien eine Population noch undifferenzierter neuronaler Vorläuferzellen zu isolieren, die in Kultur zu Neuronen ausdifferenzieren (Rohrer et al., 1985). Durch dieses spezielle Präparat ist es erst möglich, neuronale DRG-Vorläuferzellen, die noch nicht alle für DRG-Neurone typischen Arten von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen besitzen, zu untersuchen. DRG-Vorläuferzellen zeigen in den ersten Stunden in Kultur als einzigen Einwärtsstrom einen LVA- Ca^{2+} -Strom. Nach 25-30 Stunden in Kultur sind diese Zellen schließlich soweit differenziert, daß sie alle DRG-typischen Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme zeigen (Rohrer et al., 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde der Zeitverlauf der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in der Größenordnung von Stunden als Grundlage für weitere Untersuchungen bestimmt.

1.1. Messung von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in Isolation

Um in Kulturen neuronaler DRG-Vorläuferzellen den Zeitverlauf der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in der Größenordnung von Stunden bestimmen zu können, ist es notwendig, Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme getrennt zu messen. Daher wurden zunächst in 25-30 Stunden lang kultivierten Zellen Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme isoliert und auf ihre pharmakologische Blockierbarkeit hin untersucht. Die Messung von Ionenströmen erfolgte mit Hilfe der Ganzzellaufleitung der patch-clamp-Technik (Hamill et al., 1981) unter voltage-clamp-Bedingungen.

Na⁺-Ströme wurden isoliert durch Blockierung der spannungsabhängigen Ca²⁺- und K⁺-Ströme. Um Ca²⁺-Ströme zu blockieren, wurde eine Ca²⁺-freie und 0.5mM Cd²⁺-haltige (Cd²⁺ blockiert Ca²⁺-Ströme in DRG-Neuronen; Carbone und Lux, 1987a) extrazelluläre Lösung verwendet. K⁺-Ströme wurden durch die K⁺-Kanalblocker TEA und 4-AP extrazellulär, TEA intrazellulär und durch Verwendung einer K⁺-freien intrazellulären Lösung blockiert. Die extrazelluläre Lösung enthielt 120mM Na⁺, während die intrazelluläre Lösung Na⁺-frei war. Das Haltepotential lag bei -80 mV. Unter diesen Bedingungen konnten in Zellen nach 25-30 Stunden in Kultur spannungsabhängige Na⁺-Ströme mit ähnlicher Kinetik (Abb. 6A) wie in differenzierten DRG-Neuronen (Carbone und Lux, 1986b) beobachtet werden. Diese Na⁺-Ströme waren vollständig durch extrazelluläre Zugabe von 3×10^{-6} M TTX blockierbar (Abb. 6A).

Ca²⁺-Ströme wurden isoliert durch Blockierung der spannungsabhängigen Na⁺- und K⁺-Ströme. Um Na⁺-Ströme zu blockieren, wurde eine TTX-haltige, Na⁺-freie extrazelluläre Lösung verwendet. K⁺-Ströme wurden wie bei der Isolierung von Na⁺-Strömen blockiert. Ca²⁺-Ströme sind abhängig von einem aktiven Metabolismus der Zelle und zeigen daher bei Perfusion des Zellinneren, wie es bei der Ganzzellableitung geschieht, eine Abnahme der Amplitude ("run-down"). Um diesen für Ca²⁺-Ströme typischen run-down so weit als möglich zu reduzieren, enthielt die intrazelluläre Lösung ATP, cAMP, Mg²⁺ (Kostyuk et al., 1981; Byerly und Yazejian, 1986; Chad und Eckert, 1986). Die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration betrug 5mM; die intrazelluläre 3×10^{-9} M. Das Haltepotential lag bei -80 mV. Unter diesen Bedingungen konnten in Zellen nach 25-30 Stunden in Kultur ähnliche spannungsabhängige Ca²⁺-Ströme (Abb. 6B) wie in differenzierten DRG-Neuronen (Abb. 1; Carbone und Lux, 1987a) beobachtet werden. Wurden die Zellen nach -30 mV Membranpotential depolarisiert, so war ein innerhalb 100 ms vollständig inaktivierender Ca²⁺-Strom meßbar. Dieser Ca²⁺-Strom entsprach dem in weiter differenzierten DRG-Neuronen vorhandenen LVA-Ca²⁺-Strom. Wurden die Zellen nach -10 mV Membranpotential depolarisiert, so war zusätzlich ein auch



B

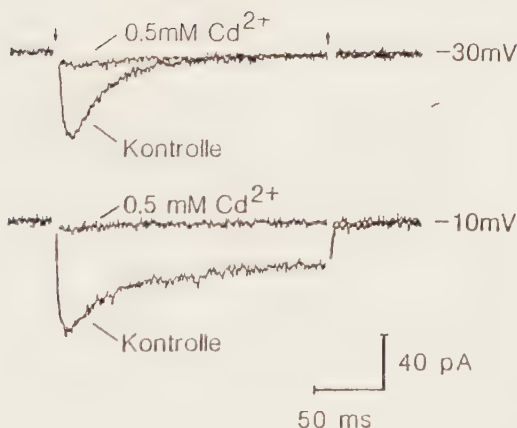


Abb. 6: Isolierte Membranströme in Kultur differenzierter DRG-Vorläuferzellen.

Wie auch in den weiteren Abbildungen ist der Beginn bzw. sind Beginn und Ende der Depolarisation der Zellmembran durch Pfeile gekennzeichnet. Haltepotential: -80 mV.

A: Na⁺-Ströme:

Nach 25-30 Stunden in Kultur sind DRG-Vorläuferzellen soweit differenziert, daß sie einen spannungsabhängigen Na⁺-Strom besitzen. Der isolierte Na⁺-Strom ist durch TTX vollständig blockierbar. Extrazell. Lsg.: 120Na⁺.

B: Ca²⁺-Ströme:

Bei -30 mV Membranpotential ist nur der in 100 ms vollständig inaktivierte LVA-Ca²⁺-Strom vorhanden, während bei -10 mV, bedingt durch den langsam inaktivierenden HVA-Ca²⁺-Strom, zusätzlich eine nach 200 ms persistierende Komponente des Ca²⁺-Stroms vorhanden ist. Die isolierten Ca²⁺-Ströme sind durch 0.5 mM Cd²⁺ blockierbar. Extrazell. Lsg.: 5Ca²⁺.

nach 200 ms persistierender, langsam inaktivierender Ca^{2+} -Strom beobachtbar. Dieser Ca^{2+} -Strom entsprach dem HVA- Ca^{2+} -Strom älterer DRG-Neurone. Diese Ca^{2+} -Ströme waren blockierbar durch 0.5 mM Cd^{2+} (Abb. 6B).

Die vollständige Blockierbarkeit der gemessenen Na^{+} - und Ca^{2+} -Ströme durch spezifische Na^{+} - bzw. Ca^{2+} -Kanalblocker zeigt, daß die verwendeten intra- und extrazellulären Bedingungen für die Isolation von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen geeignet sind.

1.2. Expression von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen in kultivierten DRG-Vorläuferzellen

Um den zeitlichen Verlauf der Expression von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen in kultivierten DRG-Vorläuferzellen zu verfolgen, wurden Na^{+} - und Ca^{2+} -Ströme wie in 1.1. beschrieben zu verschiedenen Zeitpunkten in Kultur isoliert. Die Gesamtzahl der untersuchten Zellen betrug $n=105$ für Na^{+} -Ströme und $n=113$ für Ca^{2+} -Ströme. Die neuronalen Vorläuferzellen hafteten nach einer Stunde in Kultur ausreichend am Substrat. Sie konnten bereits zu diesem Zeitpunkt aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie (siehe C 1.1.) identifiziert und auf das Vorhandensein von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen hin untersucht werden.

1.2.1. Expression von Na^{+} -Strömen

Nach 1-10 Stunden in Kultur konnte in keiner der untersuchten Zellen ein spannungsabhängiger Na^{+} -Strom beobachtet werden (Abb. 7A). Nach 15-20 Stunden in Kultur jedoch zeigten 44% der untersuchten Zellen einen spannungsabhängigen Na^{+} -Strom. Nach 25-30 Stunden in Kultur schließlich waren Na^{+} -Ströme in 90% der untersuchten Zellen vorhanden (Abb. 7B). Diese Na^{+} -Ströme aktivierten bei -40 mV Membranpotential und erreichten ihre maximale Amplitude bei -10 mV Membranpotential (Abb. 7C). Die "time-to-peak" nahm mit zunehmender Depolarisierung ab und sie inaktivierten

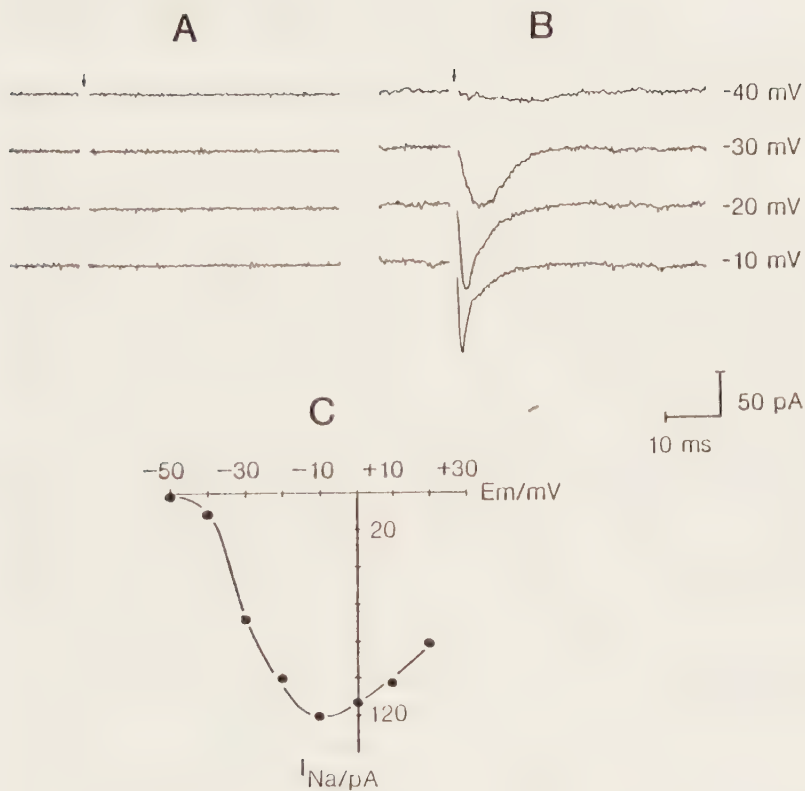


Abb. 7: Expression von Na⁺-Strömen in differenzierenden DRG-Vorläuferzellen.

Haltepotential: -80 mV. Extrazell. Lsg.: 120Na⁺.

A: In den ersten 10 Stunden in Kultur sind keine Na⁺-Ströme nachweisbar.

B: Nach 20-30 Stunden in Kultur sind Na⁺-Ströme ähnlicher Kinetik und Spannungsabhängigkeit wie in differenzierten DRG-Neuronen vorhanden.

C: Strom-Spannungscharakteristik der in B gezeigten Na⁺-Ströme.

innerhalb von 10 ms bei -10 mV Membranpotential (Abb. 7B). Diese frühen Na^+ -Ströme entsprachen damit in ihrer Kinetik und Spannungsabhängigkeit den Na^+ -Strömen differenzierter DRG-Neurone (Carbone und Lux, 1986b).

1.2.2. Expression von Ca^{2+} -Strömen

Nach 1-5 Stunden in Kultur konnten in 54% der Zellen und nach 5-10 Stunden in 82% der Zellen mehr als 5 pA große Ca^{2+} -Ströme nachgewiesen werden (Abb. 8A). Diese Ca^{2+} -Ströme inaktivierten vollständig innerhalb von 100 ms bei allen Membranpotentialen positiver als -30 mV. Sie aktivierten bei einem Membranpotential von -50 mV und erreichten ihre maximale Amplitude bei -30 bis -20 mV Membranpotential (Abb. 8B). Nach 15-20 Stunden in Kultur konnten in 100% der untersuchten Zellen Ca^{2+} -Ströme nachgewiesen werden. Jedoch inaktivierten diese Ca^{2+} -Ströme in 41% der Zellen innerhalb von 200 ms nicht mehr vollständig, sodaß nach 200 ms bei -10 mV Membranpotential mehr als 5 pA persistierender Ca^{2+} -Strom vorhanden waren. Nach 25-30 Stunden in Kultur zeigten 85% der Zellen eine solche zusätzliche, persistierende Ca^{2+} -Stromkomponente (Abb. 9A). Diese zusätzliche Komponente aktivierte bei einem Membranpotential von -20 mV und erreichte ihr Maximum bei 0 mV Membranpotential (Abb. 9B). Die Strom-Spannungs-Charakteristik der Ca^{2+} -Ströme erhielt durch diese zusätzliche Komponente eine zweigipfelige Form (Abb. 9B).

Die in den ersten 10 Stunden meßbaren Ca^{2+} -Ströme entsprachen in ihrer Kinetik und Spannungsabhängigkeit den isolierten LVA- Ca^{2+} -Strömen differenzierter DRG-Neurone (Carbone und Lux, 1987a). Die, beginnend nach 15 Stunden, zusätzlich auftretende persistierende Ca^{2+} -Stromkomponente entsprach in Kinetik und Spannungsabhängigkeit dem HVA- Ca^{2+} -Strom (Carbone und Lux, 1987a). Dies zeigt, daß die beiden in DRG-Neuronen vorhandenen Typen von Ca^{2+} -Strömen nicht gleichzeitig exprimiert werden, sondern der LVA- Ca^{2+} -Strom deutlich früher nachweisbar ist, als der HVA- Ca^{2+} -Strom.

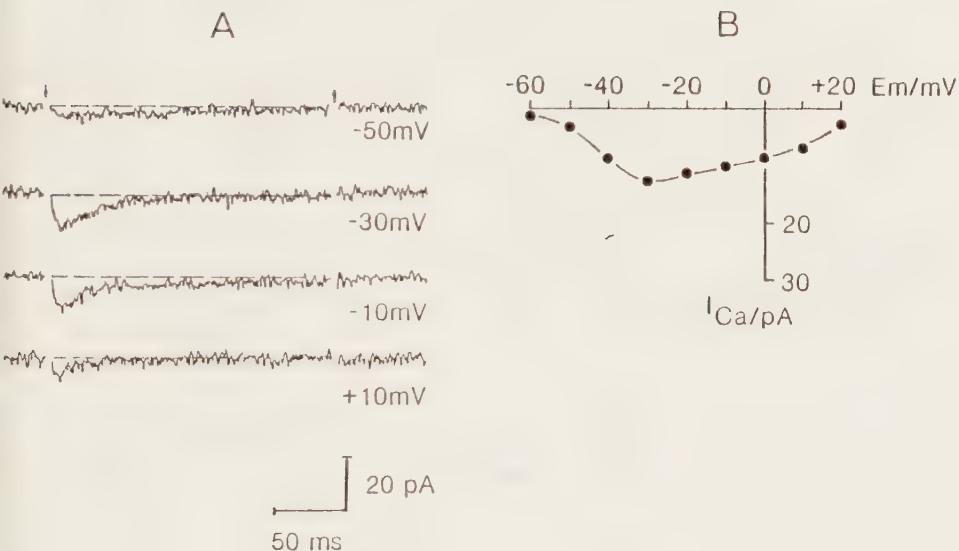


Abb. 8: Ca^{2+} -Ströme in 1-10 Stunden lang kultivierten DRG-Vorläuferzellen.

Haltepotential: -80 mV. Extrazell. Lsg.: 5Ca^{2+} .

A: Die Ca^{2+} -Ströme aktivierten zwischen -60 und -50 mV Membranpotential und inaktivierten bei Membranpotentialen positiver als -30 mV vollständig innerhalb von 100 ms. Sie entsprachen damit in Kinetik und Spannungsabhängigkeit den LVA- Ca^{2+} -Strömen differenzierter DRG-Neurone. HVA- Ca^{2+} -Ströme waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachweisbar.

B: Strom-Spannungcharakteristik der in A gezeigten Ca^{2+} -Ströme.

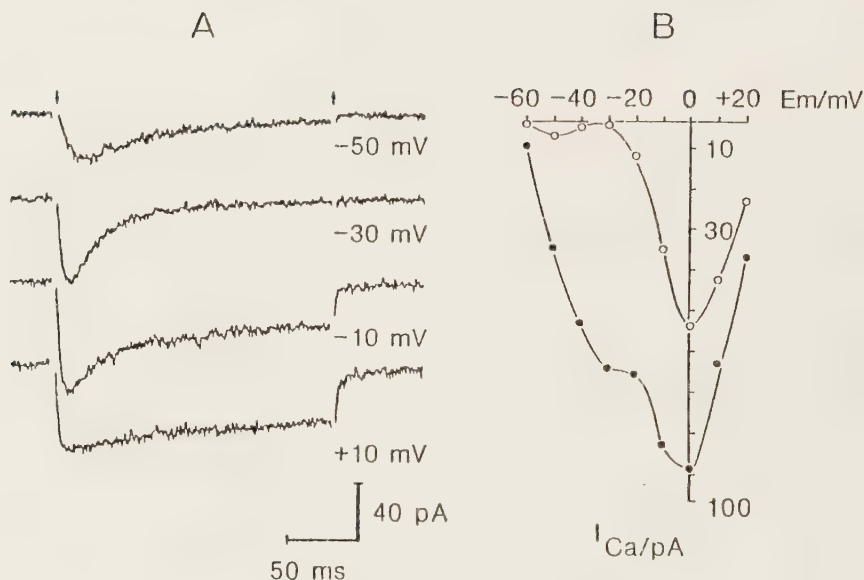


Abb. 9: Ca^{2+} -Ströme in 25-30 Stunden lang kultivierten DRG-Vorläuferzellen.

Haltepotential: -80 mV. Extrazell. Lsg.: $5Ca^{2+}$.

A: Neben den zwischen -60 und -50 mV aktivierenden und bei -30 mV innerhalb von 100 ms vollständig inaktivierenden LVA- Ca^{2+} -Strömen, ist eine nach 200 ms persistierende und bei -20 mV aktivierende, zusätzliche Ca^{2+} -Stromkomponente vorhanden. Diese zusätzliche Komponente entspricht in Kinetik und Spannungsabhängigkeit den HVA- Ca^{2+} -Strömen differenzierter DRG-Neurone.

B: Strom-Spannungscharakteristik der in A gezeigten Ca^{2+} -Ströme. Durch die zusätzliche HVA- Ca^{2+} -Stromkomponente erhält die Strom-Spannungscharakteristik eine zweigipfelige Form.

●: Maximaler Ca^{2+} -Strom.

○: Ca^{2+} -Strom nach 200 ms.

1.2.3. Zeitliche Relation der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen

Um die zeitliche Relation der Expression von Na^+ -, LVA- Ca^{2+} - und HVA- Ca^{2+} -Strömen zu untersuchen, wurde für Zeitintervalle von jeweils 5 Stunden der Prozentsatz der Zellen bestimmt, in dem mehr als 5 pA (Nachweisgrenze) des jeweiligen Stroms meßbar waren. Die Amplitude der Na^+ -Ströme wurde dabei bei -10 mV Membranpotential, die Amplitude der LVA- Ca^{2+} -Ströme als die in 200 ms inaktivierende Komponente bei -10 mV Membranpotential und die Amplitude der HVA- Ca^{2+} -Ströme als die nach 200 ms persistierende Komponente des Ca^{2+} -Stroms bei -10 mV Membranpotential bestimmt. Wie aus Abb. 10 ersichtlich, traten der Na^+ - und der HVA- Ca^{2+} -Strom etwa gleichzeitig nach ca. 15 Stunden in Kultur auf. Der zeitliche Verlauf des Auftretens beider Ströme in der untersuchten Population war ebenfalls ähnlich. Der LVA- Ca^{2+} -Strom dagegen war deutlich früher vorhanden, als der HVA- Ca^{2+} - und der Na^+ -Strom.

1.3. Abhängigkeit der Amplitude und Stromdichte von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen vom Differenzierungszustand

Um die Entwicklung der Amplitude von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen zu verfolgen, wurden die Amplituden der Ströme wie in 1.2.3. bestimmt und über einen Zeitraum von je 10 Stunden gemittelt.

Die so ermittelte mittlere Amplitude des LVA- Ca^{2+} -Stroms betrug nach 1-10 Stunden 7.4 ± 4.4 pA und nahm nach 20-30 Stunden auf 25.0 ± 11.6 pA um das 3.4fache zu. Die mittlere Amplitude des HVA- Ca^{2+} -Stroms und des Na^+ -Stroms, die nach 1-10 Stunden noch nicht nachweisbar waren, lag nach 20-30 Stunden bei 25.3 ± 18.9 pA bzw. bei 35.2 ± 48.6 pA (Abb. 11A).

Zur Berechnung der Stromdichte ist es notwendig, die Membranoberfläche, auf der die spannungsabhängigen

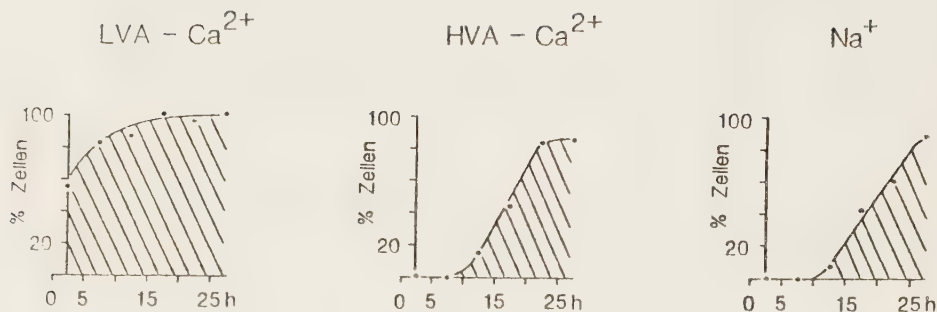


Abb. 10: Zeitliche Relation der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen.

LVA- Ca^{2+} -Ströme von mehr als 5 pA waren bereits in den ersten Stunden in Kultur in den meisten DRG-Vorläuferzellen nachweisbar. HVA- Ca^{2+} - und Na^+ -Ströme traten etwa gleichzeitig nach ca. 15 Stunden in Kultur auf.

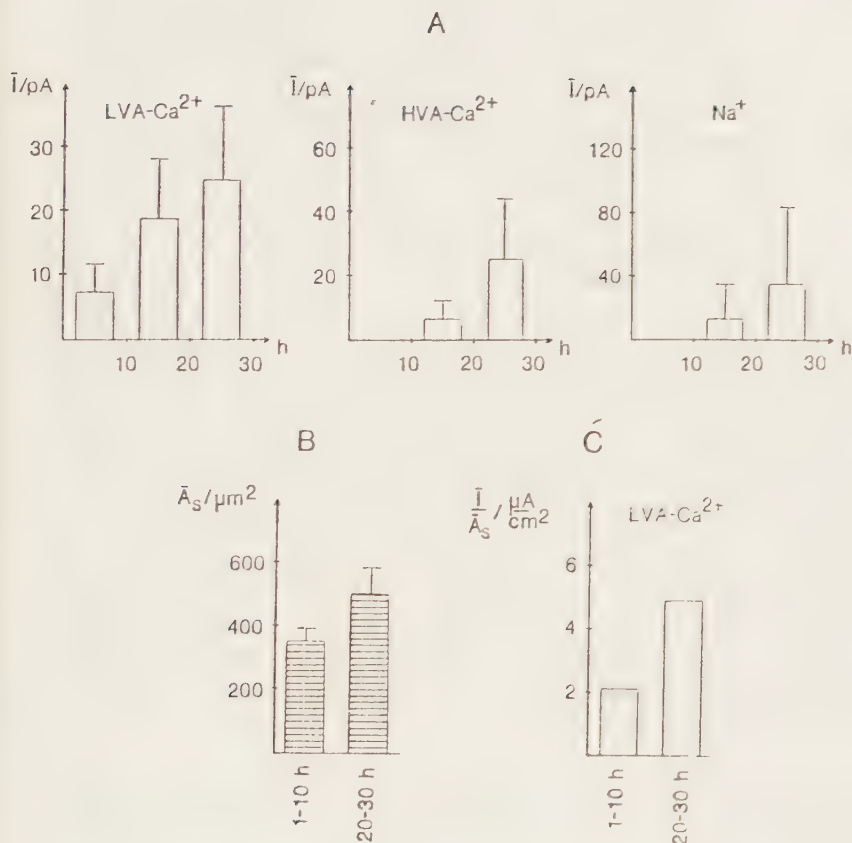


Abb. 11:

A: Mittlere Amplituden der LVA- Ca^{2+} -, HVA- Ca^{2+} - und Na^+ -Ströme ($\bar{I}$) in DRG-Vorläuferzellen in Abhängigkeit von der Zeit in Kultur.

B: Mittlere somatische Membranoberfläche ($\bar{A}_s$) von DRG-Vorläuferzellen in Abhängigkeit von der Zeit in Kultur.

C: Zunahme der mittleren Stromdichte ($\bar{I}/\bar{A}_s$) der LVA- Ca^{2+} -Ströme in Abhängigkeit von der Zeit in Kultur.

Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Ionenkanäle verteilt sind, abzuschätzen. Da bei kultivierten PC-12 Zellen gezeigt werden konnte, daß bei Zellen, deren Neurite stark auswachsen, die spannungsabhängigen Ionenkanäle fast alle auf der somatischen Membran (abgesehen von den Wachstumskegeln) lokalisiert sind (Streit und Lux, 1988), wurde zur Berechnung der Stromdichte angenommen, daß auch in den hier untersuchten Zellen die Ionenkanäle überwiegend auf dem Soma lokalisiert sind.

Zur Abschätzung der somatischen Oberfläche wurden die Zellen als Doppelkegel angenähert. Die so ermittelte Oberfläche betrug zwischen 1-10 Stunden in Kultur $351 \pm 44 \mu\text{m}^2$ und zwischen 20-30 Stunden in Kultur $508 \pm 80 \mu\text{m}^2$ (Abb. 11B). Auf diese Weise ergab sich für den LVA- Ca^{2+} -Strom eine 2.3fache Zunahme der mittleren Stromdichte, von $2.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ nach 1-10 Stunden auf $4.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ nach 20-30 Stunden in Kultur (Abb. 11C). Die Stromdichte für den HVA- Ca^{2+} -Strom lag nach 20-30 Stunden bei $5.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ und für den Na^+ -Strom bei $6.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$.

Die beobachtbare Zunahme der Stromdichte des LVA- Ca^{2+} -Stroms spricht dafür, daß, obwohl bereits eine Stunde nach Kultivierung der neuronalen Vorläuferzellen ein Teil der Zellen LVA- Ca^{2+} -Ströme zeigt, der LVA- Ca^{2+} -Strom noch nicht vollständig exprimiert ist.

1.4. Pharmakologische Blockierbarkeit und Haltepotentialabhängigkeit von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen kurz nach Beginn ihrer Expression

Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme könnten sich kurz nach ihrem ersten Auftreten in differenzierenden Vorläuferzellen in ihren Eigenschaften von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in differenzierten Neuronen unterscheiden. Daher wurde die pharmakologische Blockierbarkeit und Haltepotentialabhängigkeit von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen zu Beginn ihrer Expression untersucht.

1.4.1. TTX-Blockierbarkeit früher Na^+ -Ströme

Na⁺-Ströme wurden in Zellen nach 15-20 Stunden in Kultur mit und ohne Zugabe von TTX gemessen. Bereits die ersten meßbaren Na⁺-Ströme waren vollständig durch extrazellulär 3×10^{-6} M TTX blockierbar (Abb. 12). Dies zeigt, daß die TTX-Bindungsstelle des Na⁺-Kanals bereits zu dem Zeitpunkt, an dem der Na⁺-Kanal sich spannungsabhängig öffnen kann, vorhanden ist. Ein Hinweis auf das Vorhandensein TTX-insensitiver Na⁺-Kanäle konnte nicht erhalten werden.

1.4.2. Cd²⁺-Blockierbarkeit und Haltepotentialabhängigkeit früher Ca²⁺-Ströme

Ähnlich wie in 25-30 Stunden kultivierten Zellen (Abb. 6B) und in differenzierten DRG-Neuronen (Carbone und Lux, 1987a) waren auch die Ca²⁺-Ströme in Zellen nach 1-10 Stunden in Kultur durch 0.5 mM Cd²⁺ blockierbar (Abb. 13A).

Wie in differenzierten DRG-Neuronen (Carbone und Lux, 1987a) waren die in 1-10 Stunden kultivierten Zellen meßbaren LVA-Ca²⁺-Ströme bei einer Reduktion des Haltepotentials von -80 auf -50 mV nicht mehr nachweisbar (Abb. 13B). Die HVA-Ca²⁺-Ströme in 25-30 Stunden kultivierten Zellen waren dagegen, ähnlich wie in weiter differenzierten DRG-Neuronen, auch bei einem Haltepotential von -50 mV beobachtbar (Abb. 13C).

Na⁺- und Ca²⁺-Ströme in differenzierenden neuronalen Vorläuferzellen unterscheiden sich daher weder in ihrer Kinetik und Spannungsabhängigkeit (Kap. 1.2) noch in ihrer pharmakologischen Blockierbarkeit und Haltepotentialabhängigkeit von Na⁺- und Ca²⁺-Strömen in differenzierten DRG-Neuronen. Dies spricht dafür, daß die Na⁺- und Ca²⁺-Kanalproteine bereits zu Beginn der Expression von Ionenströmen in ihrer endgültigen Struktur vorliegen.

1.5. pH-induzierte Na⁺-Ströme

Eine weitere Möglichkeit, neben der Messung spannungsabhängiger Ca²⁺-Ströme, das Vorhandensein von Ca²⁺-Kanälen zu

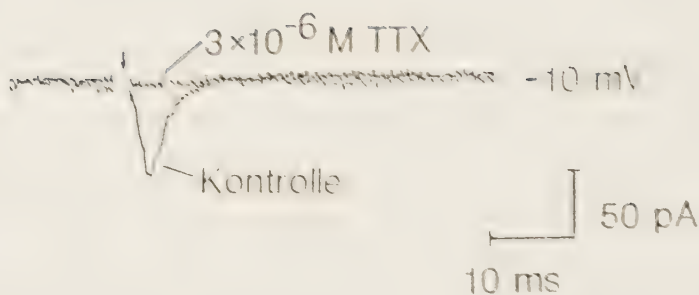


Abb. 12: TTX-Blockierbarkeit früher Na^+ -Ströme.

Haltepotential: -80 mV . Extrazell. Lsg.: 120 Na^+ .

Bereits die ersten, in DRG-Vorläuferzellen meßbaren Na^+ -Ströme nach 15-20 Stunden in Kultur waren vollständig durch extrazelluläre Zugabe von TTX blockierbar.

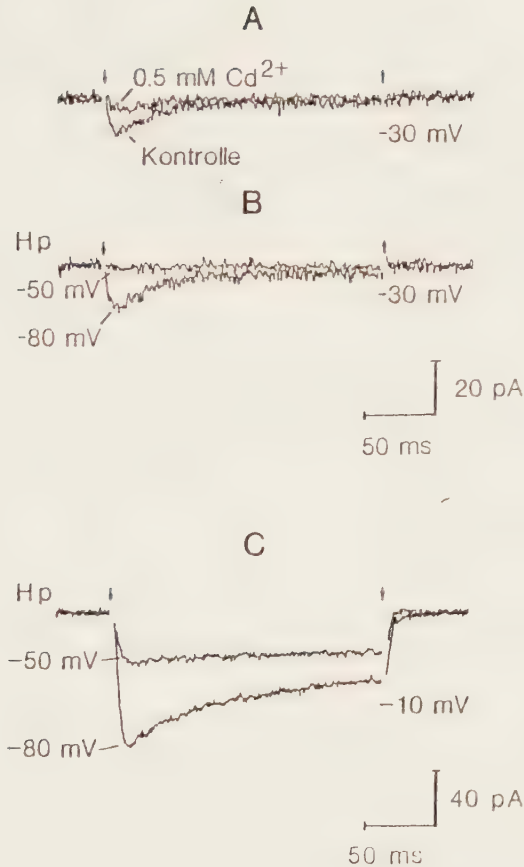


Abb. 13:

Extrazell. Lsg: 5Ca^{2+} .

A: Die in den ersten 10 Stunden in Kultur in DRG-Vorläuferzellen meßbaren LVA- Ca^{2+} -Ströme waren durch extrazellulär 0.5 mM Cd^{2+} blockierbar. Haltepotential: -80 mV .

B: Die in den ersten 10 Stunden in Kultur meßbaren LVA- Ca^{2+} -Ströme waren nur von Haltepotentialen negativer als -50 mV aus nachweisbar. Hp: Haltepotential.

C: Nach 25-30 Stunden in Kultur waren sowohl LVA- Ca^{2+} - als auch HVA- Ca^{2+} -Ströme nachweisbar. Im Gegensatz zu den LVA- Ca^{2+} -Strömen waren jedoch die HVA- Ca^{2+} -Ströme auch von einem Haltepotential von -50 mV aus aktivierbar. Hp: Haltepotential.

untersuchen, besteht durch die pH-induzierten Na^+ -Ströme (Konnerth et al., 1987; Davies et al., 1988). Nach einer schnellen extrazellulären pH-Änderung von $\text{pH}=7.9$ nach $\text{pH}=6.7$ werden in DRG-Neuronen Na^+ -Ströme aktiviert. Diese pH-induzierten Na^+ -Ströme inaktivieren mit einer Zeitkonstanten von 300 ms und sind durch Ca^{2+} -Kanalblocker blockierbar. Während des pH-induzierten Na^+ -Stroms ist der durch Membrandepolarisation aktivierbare Ca^{2+} -Strom blockiert, was darauf hindeutet, daß dieser Na^+ -Strom durch transformierte, spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle fließt (Davies et al., 1988).

In bis zu 10 Stunden kultivierten neuronalen Vorläuferzellen ist als einziger spannungsabhängiger Einwärtsstrom der LVA- Ca^{2+} -Strom nachweisbar. Um festzustellen, ob in solchen Zellen ein ähnlicher pH-induzierter Na^+ -Strom wie in weiter differenzierten DRG-Neuronen vorliegt, wurde eine schnelle extrazelluläre pH-Änderung von $\text{pH}=7.9$ nach $\text{pH}=6.0$ durchgeführt. Die extrazelluläre Lösung enthielt dabei sowohl Na^+ (40 bzw. 130 mM) als auch Ca^{2+} (5 bzw. 0.1 mM); die intrazelluläre Lösung enthielt 100 mM Na^+ .

Nach 1-10 Stunden in Kultur konnte in allen untersuchten Zellen mit neuronaler Morphologie ($n=49$) ein solcher pH-induzierter Na^+ -Strom, der durch Ersetzen des extrazellulären Na^+ durch Cholin blockierbar war, beobachtet werden (Abb. 14A). Dieser pH-induzierte Strom inaktivierte mit ähnlichem Zeitverlauf wie in differenzierten DRG-Neuronen und das Umkehrpotential lag, wie aufgrund der Wahl der extrazellulären (40mM) und intrazellulären (100mM) Na^+ -Konzentration zu erwarten, bei -20 mV (Abb. 14B).

Um zu untersuchen, ob der spannungsabhängige LVA- Ca^{2+} -Strom während des pH-induzierten Na^+ -Stroms blockiert ist, wurden die Zellen während des pH-induzierten Stroms von -80 mV nach -20 mV depolarisiert. Die extrazelluläre Lösung enthielt 40 mM Na^+ und 5 mM Ca^{2+} . Da das Gleichgewichtspotential des pH-induzierten Na^+ -Stroms unter den gewählten Bedingungen bei -20 mV lag, stellt der bei Depolarisation nach -20 mV meßbare Strom den LVA- Ca^{2+} -Strom dar. Während des pH-induzierten Stroms war der LVA- Ca^{2+} -Strom in Zellen, die

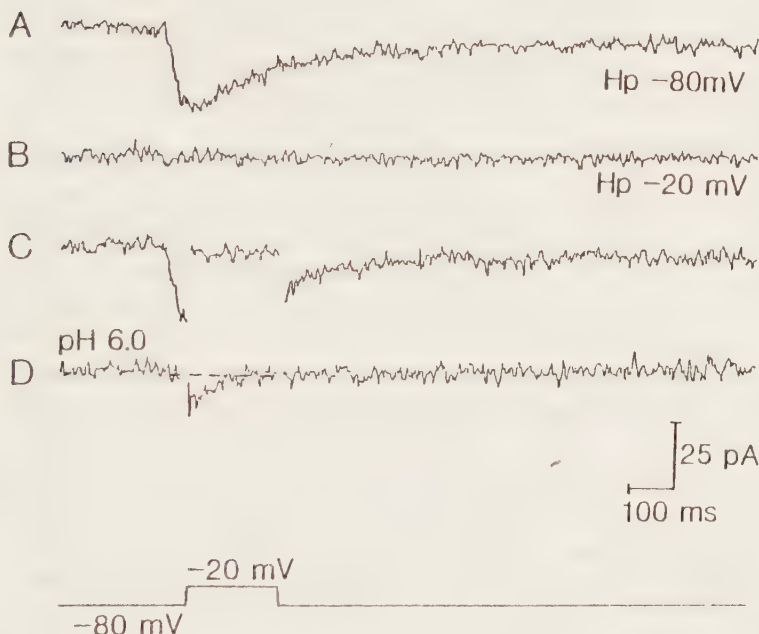


Abb. 14: pH-induzierte Na^+ -Ströme

Extrazell. Lsg.: 40Na^+ , 5Ca^{2+} . Intrazell. Lsg.: 100Na^+ .

A: Durch eine schnelle extrazelluläre pH-Änderung von pH=7.9 nach 6.0 konnte in DRG-Vorläuferzellen nach 5-10 Stunden in Kultur ein pH-induzierter Na^+ -Strom ausgelöst werden. Hp: Haltepotential.

B: Entsprechend der gewählten extra- und intrazellulären Na^+ -Konzentration lag das Gleichgewichtspotential dieses pH-induzierten Na^+ -Stroms bei -20 mV. Hp: Haltepotential.

C: Wurde die gleiche Zelle während des pH-induzierten Na^+ -Stroms zum Gleichgewichtspotential des Na^+ -Stroms (-20 mV) hin depolarisiert, so konnte kein LVA- Ca^{2+} -Strom durch die Depolarisation ausgelöst werden. Haltepotential: -80 mV.

D: Dieselbe Zelle zeigte jedoch nach längerer Applikation eines extrazellulären pH von 6.0 einen deutlichen LVA- Ca^{2+} -Strom bei gleicher Depolarisation wie in C. Haltepotential: -80 mV.

Der spannungsabhängige LVA- Ca^{2+} -Strom von 5-10 Stunden lang kultivierten DRG-Vorläuferzellen war während des pH-induzierten Na^+ -Stroms blockiert. Dies spricht dafür, daß der pH-induzierte Na^+ -Strom in diesen Zellen durch Transformation von LVA- Ca^{2+} -Kanälen zustandekommt.

bei $\text{pH}=6.0$ einen deutlichen LVA-Ca^{2+} -Strom zeigten (Abb. 14D), blockiert (Abb. 14C). Dieses Ergebnis spricht dafür, daß der in bis zu 10 Stunden kultivierten Zellen nachweisbare pH -induzierte Na^+ -Strom durch Transformation von LVA-Ca^{2+} -Kanälen zustandekommt.

Nach 1-5 Stunden in Kultur ist in einem beträchtlichen Teil der neuronalen Vorläuferzellen noch kein LVA-Ca^{2+} -Strom nachweisbar (Abb. 10). Um zu untersuchen, ob in diesen Zellen bereits pH -induzierte Na^+ -Ströme nachgewiesen werden können, wurden der spannungsabhängige Ca^{2+} -Strom und der pH -induzierte Na^+ -Strom in bis zu 5 Stunden kultivierten Zellen untersucht. Um die Bedingungen für die jeweiligen Ströme optimal zu wählen, wurden die Ca^{2+} -Ströme in 10 mM Ca^{2+} bei $\text{pH}=7.9$ und die pH -induzierten Na^+ -Ströme in 0.1 mM Ca^{2+} , 130 mM Na^+ gemessen. In 68% der Zellen ($n=28$) war unter diesen Bedingungen sowohl ein LVA-Ca^{2+} -Strom als auch ein pH -induzierter Na^+ -Strom nachweisbar (Abb. 15A). In 32% der Zellen dagegen konnte kein Ca^{2+} -Strom nachgewiesen werden, jedoch war ein pH -induzierter Na^+ -Strom vorhanden (Abb. 15B). Für die Zellen, die einen LVA-Ca^{2+} -Strom bei Depolarisation von -80 nach -20 mV zeigten (Nachweisgrenze: 5 pA) ergab sich im Mittel ein LVA-Ca^{2+} -Strom von $15.5 \pm 6.3 \text{ pA}$ und ein pH -induzierter Na^+ -Strom bei -60 mV Haltepotential von $42.0 \pm 17.0 \text{ pA}$. Der pH -induzierte Na^+ -Strom zeigte die 2.7fache Amplitude des LVA-Ca^{2+} -Stroms (Abb. 15C). Die Zellen, in denen kein LVA-Ca^{2+} -Strom nachweisbar war, zeigten einen pH -induzierten Na^+ -Strom bei -60 mV Haltepotential von im Mittel $31.2 \pm 19.8 \text{ pA}$. Legt man ein Amplitudenverhältnis von 2.7 zugrunde, so wäre in diesen Zellen ein LVA-Ca^{2+} -Strom von ca. 10 pA zu erwarten gewesen (Abb. 15C). Es scheinen daher, aufgrund des Vorhandenseins des pH -induzierten Na^+ -Stroms, Ca^{2+} -Kanäle in Zellen exprimiert zu werden, in denen kein spannungsabhängiger Ca^{2+} -Strom meßbar ist.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß Ca^{2+} -Kanäle zunächst in einer inaktiven Vorstufe, in der sich die Kanäle nicht spannungsabhängig öffnen können, exprimiert werden.

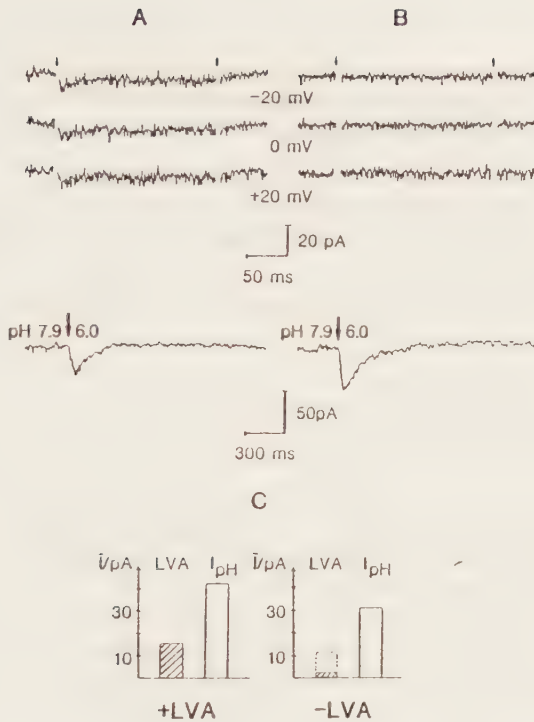


Abb. 15: pH-induzierte Na^+ -Ströme in DRG-Vorläuferzellen nach 1-5 Stunden in Kultur.

Extrazell. Lsg. für Ca^{2+} -Ströme: 10Ca^{2+} . Extrazell. Lsg. für pH-induzierte Ströme: 130Na^+ . Intrazell. Lsg.: 100Na^+ . A: Die meisten Zellen mit neuronaler Morphologie zeigten sowohl einen LVA- Ca^{2+} -Strom als auch einen pH-induzierten Strom.

B: In einigen Zellen jedoch war trotz des Vorhandenseins eines pH-induzierten Stroms kein spannungsabhängiger Ca^{2+} -Strom nachweisbar.

C: In Zellen, die einen LVA- Ca^{2+} -Strom zeigten (+LVA), war der pH-induzierte Strom bei -60 mV Haltepotential im Mittel 2.7mal so groß als der LVA- Ca^{2+} -Strom bei Depolarisation von -80 nach -20 mV. In den Zellen, in denen kein LVA- Ca^{2+} -Strom nachgewiesen werden konnte (-LVA), wäre unter der Annahme eines Amplitudenverhältnisses von 2.7 ein LVA- Ca^{2+} -Strom von ca. 10 pA (gestrichelte Linie) zu erwarten gewesen, der damit deutlich über der Nachweisgrenze von 5 pA läge. Das Fehlen des LVA- Ca^{2+} -Stroms in einigen Zellen und das gleichzeitige Vorhandensein des pH-induzierten Stroms könnte darauf hindeuten, daß Ca^{2+} -Kanäle zunächst in einer inaktiven Form, in der sie sich nicht spannungsabhängig öffnen können, exprimiert werden.

2. Zeitliche Relation der Expression spannungsabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme zur terminalen Mitose

Nervenzellen sind im ausdifferenzierten Zustand in der Regel nicht mehr teilungsfähig. Im Verlauf der neuronalen Differenzierung findet daher eine terminale Mitose statt, nach der die Neuronenvorläufer ihre Teilungsfähigkeit verlieren.

2.1. Zeitliche Relation zur terminalen Mitose in DRG-Vorläuferzellen

Werden neuronale DRG-Vorläuferzellen unter den in C 1.1. beschriebenen Bedingungen isoliert und kultiviert, so erhält man eine Population postmitotischer Zellen (Rohrer und Thoenen, 1987). Weiterhin sind DRG-Vorläuferzellen erst 6 Stunden nach dem Durchlaufen der terminalen DNS-Synthesephase in der Lage, unter den gewählten Kulturbedingungen zu überleben und sie exprimieren 18 Stunden nach der terminalen DNS-Synthesephase das neuronenspezifische Q211-Antigen (Rohrer und Thoenen, 1987). Bei der Isolation neuronaler DRG-Vorläuferzellen werden alle Zellen, die das Q211-Antigen exprimieren, abgetötet, sodaß man eine Population von Vorläuferzellen erhält, die ihre terminale DNS-Synthesephase vor mindestens 6 und höchstens 18 Stunden durchlaufen haben. Die untersuchte Population von DRG-Vorläuferzellen zeigt daher in Bezug auf den Zeitpunkt der terminalen Mitose eine Streuung von 12 Stunden.

Da es sich bei den untersuchten DRG-Vorläuferzellen um postmitotische Zellen handelt, läßt sich aus dem Auftreten der Na^+ - und HVA- Ca^{2+} -Ströme nach ca. 15 Stunden in Kultur schließen, daß zumindest der Na^+ - und HVA- Ca^{2+} -Strom erst nach der terminalen Mitose exprimiert werden. Der Zeitverlauf der Expression der Na^+ - und HVA- Ca^{2+} -Ströme innerhalb der untersuchten Population war für beide Ionenströme ähnlich (Abb. 16). Das Zeitintervall, das zwischen dem Zeitpunkt des ersten Auftretens des Na^+ - und HVA- Ca^{2+} -Stroms und dem

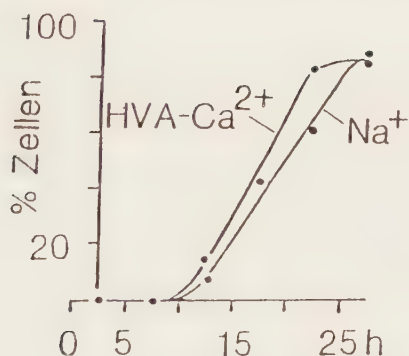


Abb. 16: Zeitverlauf der Expression von Ionenströmen in der DRG-Vorläuferpopulation.

Das Zeitintervall zwischen dem Zeitpunkt, an dem die ersten Zellen Na⁺ bzw. HVA-Ca²⁺-Ströme zeigten, und dem Zeitpunkt, an dem fast alle Zellen diese Ströme zeigten, war für den Na⁺- und den HVA-Ca²⁺-Strom gleich und betrug 10-15 Stunden. Da die untersuchte Population in Bezug auf die terminale Mitose eine Streuung von 12 Stunden aufweist, spricht dieses Ergebniss dafür, daß Na⁺- und HVA-Ca²⁺-Ströme in einer strengen zeitlichen Relation zur terminalen Mitose exprimiert werden.

Zeitpunkt, an dem alle Zellen diese Ströme zeigten, verstrich, betrug 10-15 Stunden. Da die untersuchte Population relativ zum Zeitpunkt der terminalen Mitose eine Streuung von 12 Stunden aufwies, spricht dieses Ergebniss dafür, daß sowohl der Na^+ - als auch der HVA-Ca^{2+} -Strom in einer strengen zeitlichen Relation zur terminalen Mitose exprimiert werden.

2.2. Zeitliche Relation zur terminalen Mitose in sympathischen Neuronen

Sympathische Neurone exprimieren im Gegensatz zu DRG-Zellen neuronale Eigenschaften (wie z.B. Katecholaminsynthese und das neuronale-spezifische Q211-Antigen) bereits zu einem Zeitpunkt, an dem sie noch teilungsfähig sind (Rothmann et al., 1978; Rohrer und Thoenen, 1987). Der Großteil der in sympathischen Ganglien des Hühnchenembryos am 7. Embryonaltag enthaltenen Neurone ist in der Lage sich auch nach Kultivierung noch zu teilen (Rohrer und Thoenen, 1987).

Um zu untersuchen, ob diese proliferierenden Zellen bereits spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme exprimieren, wurden Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme wie in 1.1. beschrieben gemessen. Na^+ -Ströme waren in 100% ($n=10$) (Abb. 17A) und Ca^{2+} -Ströme in 88% ($n=16$) (Abb. 17B) der untersuchten Zellen bereits nachweisbar. Dies zeigt, daß sympathische Neurone, im Gegensatz zu DRG-Neuronen, bereits vor der terminalen Mitose sowohl Na^+ - als auch Ca^{2+} -Ströme exprimieren.

3. Abhängigkeit der Expression spannungsabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme vom Zelltyp

Im Verlauf der Embryogenese bildet sich eine Vielzahl verschiedener Typen von Neuronen heraus. Die frühe Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen könnte in diesen verschiedenen Zelltypen zunächst auf die gleiche Weise erfolgen oder es könnten bereits beim ersten Auftreten spannungsabhängiger Ionenströme zelltypspezifische Unterschiede vorhanden sein.

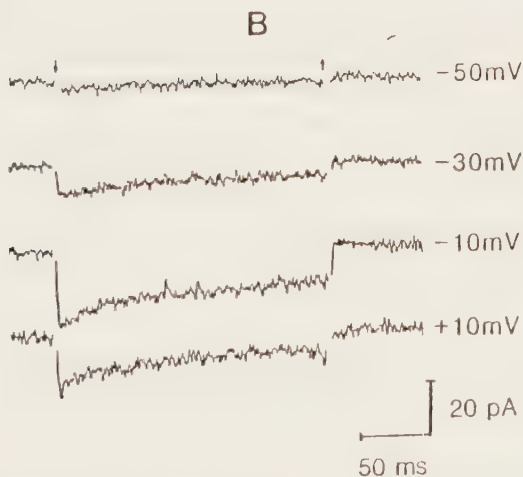
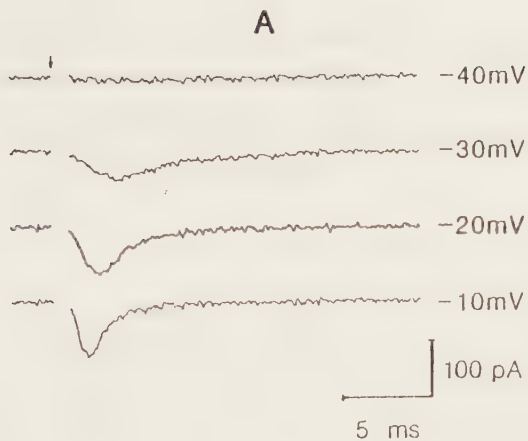


Abb. 17: Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme in proliferierenden sympathischen Neuronen.

A: Na^+ -Ströme:

Extrazell. Lsg.: 120Na^+ . Haltepotential: -80 mV .

B: Ca^{2+} -Ströme:

Extrazell. Lsg.: 5Ca^{2+} . Haltepotential: -80 mV .

Sowohl Na^+ - als auch Ca^{2+} -Ströme waren bereits in proliferierenden sympathischen Neuronen nachweisbar.

Um die Abhängigkeit der frühen Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen vom Zelltyp zu untersuchen, wurde die Untersuchung der frühen Expression von Ionenströmen an Vorläuferzellen aus dem parasympathischen Ciliarganglion des Hühnchenembryos wiederholt.

Die Ciliarganglien von 4.5 Tage alten Hühnchenembryonen enthalten neben ausdifferenzierten Neuronen und Gliazellen eine Population noch undifferenzierter neuronaler Vorläuferzellen (Rohrer und Thoenen, 1987). Diese neuronalen Vorläuferzellen können in analoger Weise wie neuronale Vorläuferzellen aus dem Hinterwurzelganglion isoliert und kultiviert werden. In Kultur entwickeln Vorläuferzellen aus dem Ciliarganglion innerhalb von 24 Stunden neuronale Eigenschaften (neuron-spezifische Q211-Antigen, Rohrer und Thoenen, 1987), jedoch benötigen sie im Unterschied zu DRG-Vorläuferzellen zum Überleben die Anwesenheit ausdifferenzierter Gliazellen. Daher wurden bei der Isolierung neuronaler Vorläuferzellen aus dem Ciliarganglion nur die ausdifferenzierten Neurone abgetötet. Die neuronalen Vorläuferzellen konnten aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie eindeutig von Gliazellen unterschieden werden (siehe C 1.1.).

3.1. Unabhängigkeit der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen vom Vorhandensein ausdifferenzierter Gliazellen

Um die Vergleichbarkeit der Kulturbedingungen sicherzustellen, wurde die Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in DRG-Vorläuferzellen, zu deren Isolierung nur die ausdifferenzierten Neurone, jedoch nicht die ausdifferenzierten Gliazellen abgetötet worden waren, untersucht. Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme wurden wie in 1.1. beschrieben isoliert.

In solchen Kulturen konnte nach 1-10 Stunden in allen untersuchten Zellen weder ein HVA- Ca^{2+} - ($n=13$) noch ein Na^+ -Strom ($n=12$) nachgewiesen werden. LVA- Ca^{2+} -Ströme waren wie in Kulturen ohne ausdifferenzierte Gliazellen vorhanden.

Ein Einfluß des Vorhandenseins ausdifferenzierter Gliazellen auf die Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen konnte daher nicht gezeigt werden, sodaß die Kulturbedingungen für DRG- und Ciliarvorläuferzellen als vergleichbar angesehen werden können.

3.2. K^+ -Ströme in Ciliarvorläuferzellen nach 1-5 Stunden in Kultur

Eine Stunde nach Kultivierung waren die Ciliarvorläuferzellen ausreichend am Substrat angehaftet und konnten mit Hilfe der Ganzzellableitung der patch-clamp-Technik auf das Vorhandensein von spannungsabhängigen Ionenströmen hin untersucht werden.

Zunächst wurden alle spannungsabhängigen Ionenströme, ohne einzelne Stromtypen zu isolieren, nach 1-5 Stunden in Kultur beobachtet. Dazu wurde eine intrazelluläre Lösung verwendet, die 150 mM K^+ enthielt (siehe Abb. 18); die extrazelluläre Lösung bestand aus dem Kulturmedium (F14). Das Haltepotential lag bei -80 mV.

Ähnlich wie bei DRG-Vorläuferzellen (Rohrer et al., 1985) konnte in allen untersuchten Zellen ($n=5$) ein Auswärtsstrom beobachtet werden (Abb. 18). Dieser Auswärtsstrom wurde von K^+ getragen, da er nach Ersetzen des intrazellulären K^+ durch N-Methyl-D-glucamin nicht mehr meßbar war (siehe 1.1.). Im Gegensatz zu DRG-Vorläuferzellen (Rohrer et al., 1985) waren jedoch bereits nach 1-5 Stunden deutliche Einwärtsströme, die bei Membranpotentialen positiver als -40 mV aktivierten, vorhanden (Abb. 18).

3.3. Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in kultivierten Ciliarvorläuferzellen.

Um den zeitlichen Verlauf der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in kultivierten Ciliarvorläuferzellen zu bestimmen und mit der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in kultivierten DRG-Vorläuferzellen zu vergleichen, wurden Na^+ -

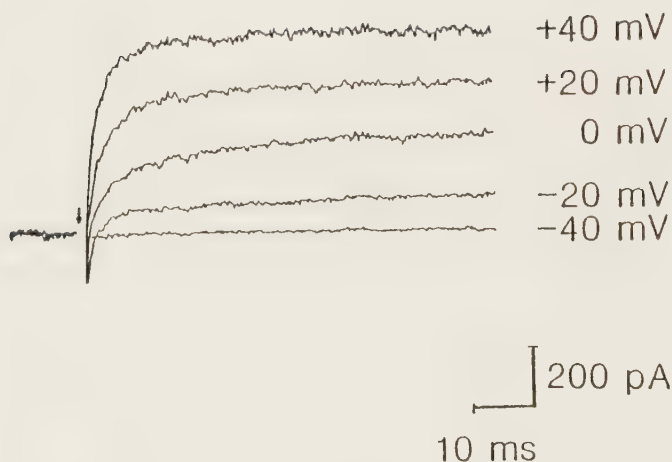


Abb. 18: Membranströme von Ciliarvorläuferzellen nach 1-5 Stunden in Kultur.

Haltepotential: -80 mV. Extrazell. Lsg.: F14. Intrazell. Lsg.: 150K⁺ (150 mM KCl, 0.25 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7.3).

Bereits in den ersten Stunden in Kultur waren deutliche K⁺-Auswärtsströme und im Gegensatz zu DRG-Vorläuferzellen bei Membranpotentialen positiver als -40 mV aktivierende Einwärtsströme vorhanden.

und Ca^{2+} -Ströme wie in 1.1. beschrieben zu verschiedenen Zeitpunkten in Kultur isoliert. Die Anzahl der untersuchten Zellen betrug $n=46$ für Na^+ -Ströme und $n=56$ für Ca^{2+} -Ströme.

3.3.1. Expression von Na^+ -Strömen

Bereits nach 1-5 Stunden in Kultur konnten im Gegensatz zu DRG-Vorläuferzellen in 73% der untersuchten Zellen spannungsabhängige Na^+ -Ströme nachgewiesen werden (Abb. 19A). Nach 5-10 Stunden zeigten fast alle Zellen (90%) bereits einen spannungsabhängigen Na^+ -Strom. Diese Na^+ -Ströme aktivierten bei -40 bis -30 mV Membranpotential (Abb. 19B) und erreichten ihre maximale Amplitude bei -10 mV Membranpotential (Abb. 19C). Die "time-to-peak" nahm mit zunehmender Depolarisierung ab und sie inaktivierten innerhalb von 10 ms bei -10 mV Membranpotential (Abb. 19A,B). Die Na^+ -Ströme in kultivierten Ciliarvorläuferzellen entsprachen damit in ihrer Kinetik und Spannungsabhängigkeit den Na^+ -Strömen von DRG-Zellen (siehe 1.2.1.), jedoch waren sie deutlich früher vorhanden als in kultivierten DRG-Vorläuferzellen.

3.2.2. Expression von Ca^{2+} -Strömen

In 73% der Ciliarvorläuferzellen nach 1-5 Stunden in Kultur konnten mehr als 5 pA große Ca^{2+} -Ströme nachgewiesen werden (Abb. 20A). Diese Ca^{2+} -Ströme inaktivierten wie in 1-5 Stunden lang kultivierten DRG-Zellen innerhalb von 100 ms bei allen Membranpotentialen positiver als -30 mV. Sie aktivierten bei einem Membranpotential von -50 mV und erreichten ihre maximale Amplitude bei -20 mV Membranpotential (Abb. 20B). Bereits nach 5-10 Stunden in Kultur zeigten 64% der Zellen einen innerhalb von 200 ms nicht mehr vollständig inaktivierenden Ca^{2+} -Strom (>5 pA nach 200 ms bei -10 mV Membranpotential). Nach 10-15 Stunden in Kultur war diese zusätzliche, persistierende Ca^{2+} -Stromkomponente bei fast allen Zellen (89%) beobachtbar. Diese zusätzliche

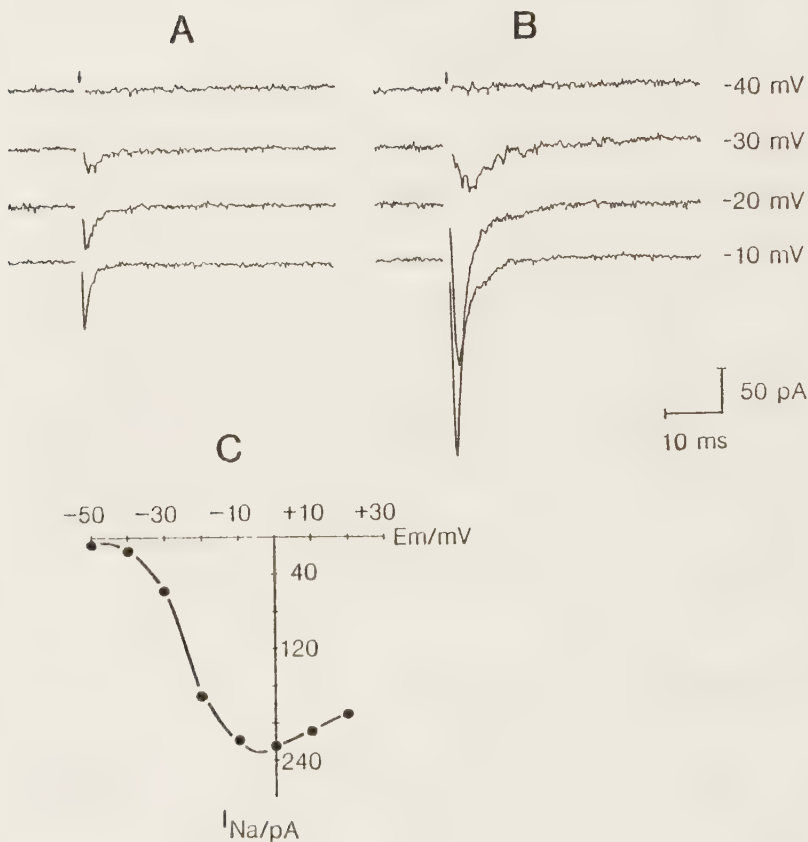


Abb. 19: Na⁺-Ströme in differenzierenden Ciliarvorläuferzellen.

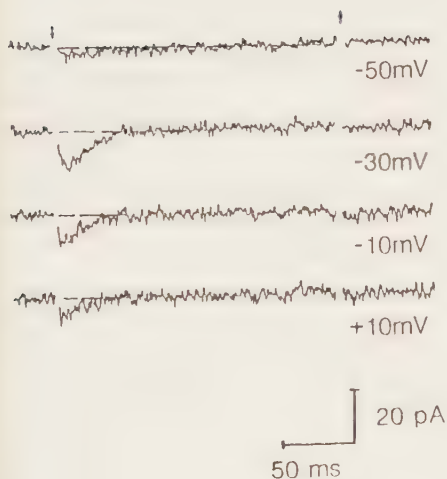
Haltepotential: -80 mV. Extrazell. Lsg.: 120Na⁺.

A: Im Gegensatz zu DRG-Vorläuferzellen sind bereits in den ersten 10 Stunden in Kultur Na⁺-Ströme nachweisbar.

B: Na⁺-Ströme nach 20-30 Stunden in Kultur.

C: Strom-Spannungscharakteristik der in B gezeigten Na⁺-Ströme.

A



B

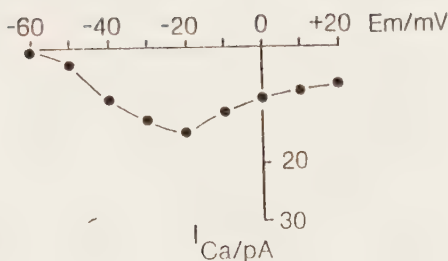


Abb. 20: Ca^{2+} -Ströme in 1-5 Stunden lang kultivierten Ciliarvorläuferzellen.

Haltepotential: -80 mV. Extrazell. Lsg.: 5Ca^{2+} .

A: Die Ca^{2+} -Ströme aktivierten bei -50 mV Membranpotential und inaktivierten bei Membranpotentialen positiver als -30 mV vollständig innerhalb von 100 ms. Sie entsprachen damit in Kinetik und Spannungsabhängigkeit den isolierten LVA- Ca^{2+} -Strömen differenzierter DRG-Neurone.

B: Strom-Spannungscharakteristik der in A gezeigten Ca^{2+} -Ströme.

Komponente (Abb. 21A) aktivierte bei einem Membranpotential von -30 bis -20 mV und erreichte ihr Maximum bei -10 mV Membranpotential (Abb. 21B).

Die nach 1-5 Stunden meßbaren Ca^{2+} -Ströme entsprachen in ihrer Kinetik und Spannungsabhängigkeit den LVA- Ca^{2+} -Strömen der DRG-Zellen (siehe 1.2.2.). Die nach 5-10 Stunden auftretende zusätzliche, persistierende Ca^{2+} -Stromkomponente entsprach in ihrer Kinetik und Spannungsabhängigkeit den HVA- Ca^{2+} -Strömen der DRG-Zellen. Nach 25-30 Stunden in Kultur war bereits bei -50 mV Membranpotential ein deutlicher Ca^{2+} -Strom vorhanden, der bei -30 mV nach 100 ms vollständig inaktivierte (Abb. 21A). Dies zeigt, daß neben dem HVA- Ca^{2+} -Strom auch der LVA- Ca^{2+} -Strom vorhanden ist.

Die Expression der Ca^{2+} -Ströme in Ciliarvorläuferzellen zeigte die gleiche Sequenz wie bei DRG-Vorläuferzellen; die LVA- Ca^{2+} -Ströme waren vor den HVA- Ca^{2+} -Strömen nachweisbar. Jedoch erfolgte die Expression des HVA- Ca^{2+} -Stroms im Gegensatz zu DRG-Zellen bereits nach kurzer Zeit in Kultur.

3.3.3. Vergleich der Expression von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen in Ciliar- und DRG-Vorläuferzellen

Zur Bestimmung der zeitlichen Relation der Expression von Na^{+} -, LVA- Ca^{2+} - und HVA- Ca^{2+} -Strömen in Ciliarvorläuferzellen wurde, wie bei DRG-Vorläuferzellen, für Zeitintervalle von jeweils 5 Stunden der Prozentsatz der Zellen bestimmt, in dem mehr als 5 pA (Nachweisgrenze) des jeweiligen Stroms meßbar waren. Die Amplitude der Na^{+} -Ströme wurde dabei bei -10 mV Membranpotential, die Amplitude der LVA- Ca^{2+} -Ströme als die in 200 ms inaktivierende Komponente bei -10 mV Membranpotential und die Amplitude der HVA- Ca^{2+} -Ströme als die nach 200 ms persistierende Komponente des Ca^{2+} -Stroms bei -10 mV Membranpotential bestimmt (siehe auch 3.6.2.). Abb. 22 zeigt, daß der LVA- Ca^{2+} -Strom und der Na^{+} -Strom bereits zu Beginn in einem Großteil der Zellen vorhanden waren. Der HVA- Ca^{2+} -Strom trat innerhalb der ersten 10 Stunden in Kultur, jedoch deutlich nach dem LVA- Ca^{2+} -Strom, auf.

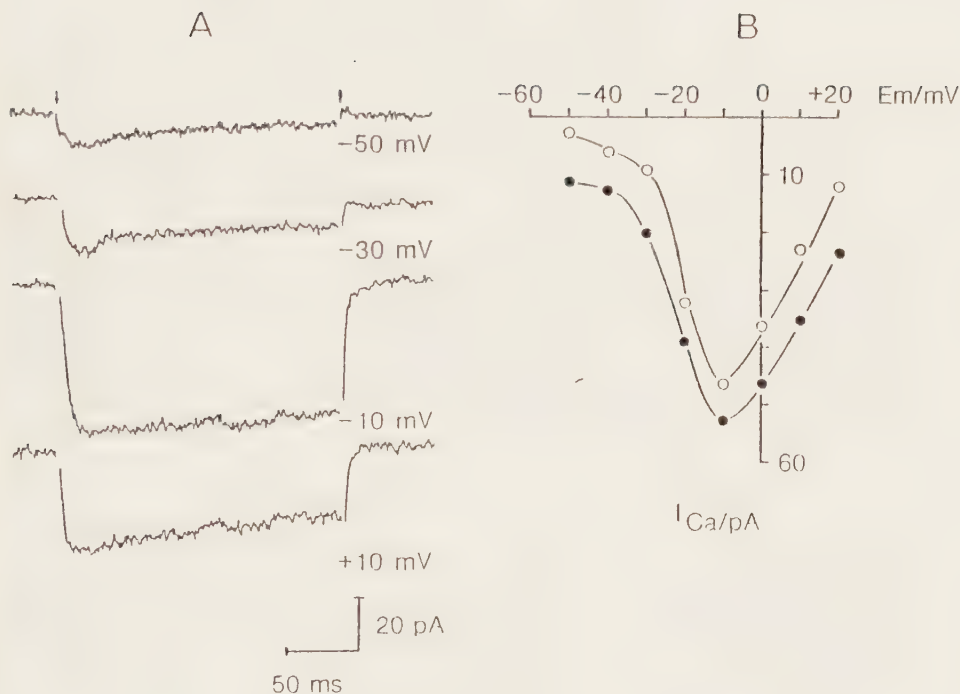


Abb. 21: Ca^{2+} -Ströme in 25-30 Stunden lang kultivierten Ciliarvorläuferzellen.

Haltepotential: -80 mV. Extrazell. Lsg.: $5Ca^{2+}$.

A: Neben den zwischen -60 und -50 mV aktivierenden LVA- Ca^{2+} -Strömen ist bei -10 mV Membranpotential eine nach 200 ms persistierende zusätzliche Ca^{2+} -Stromkomponente vorhanden. Diese zusätzliche Komponente entspricht in Kinetik und Spannungsabhängigkeit den HVA- Ca^{2+} -Strömen differenzierter DRG-Neurone.

B: Strom-Spannungscharakteristik der in A gezeigten Ca^{2+} -Ströme.

●: Maximaler Ca^{2+} -Strom.

○: Ca^{2+} -Strom nach 200 ms.

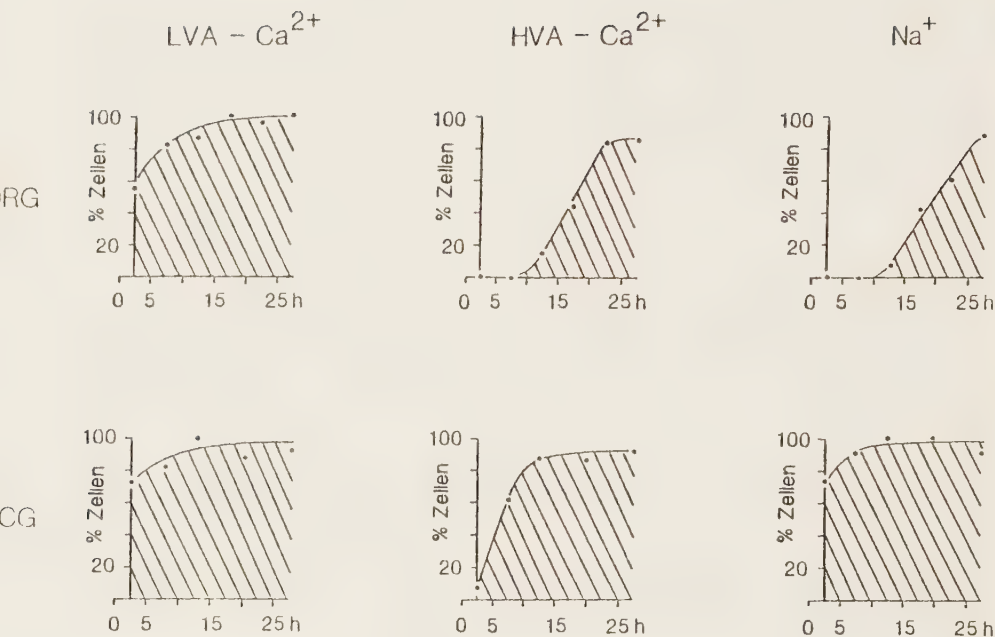


Abb. 22: Vergleich der zeitlichen Relation der Expression von Na⁺- und Ca²⁺-Strömen.

DRG: Zeitliche Relation in DRG-Vorläuferzellen.

CG: Zeitliche Relation in Ciliarvorläuferzellen.

In Ciliarvorläuferzellen waren sowohl der Na⁺- als auch der HVA-Ca²⁺-Strom früher nachweisbar als in DRG-Vorläuferzellen. Besonders beachtenswert ist, daß in Ciliarvorläuferzellen die Na⁺-Ströme vor den HVA-Ca²⁺-Strömen vorhanden waren, während beide Ströme in DRG-Vorläuferzellen gleichzeitig auftraten. Darüberhinaus waren auch in Ciliarvorläuferzellen die LVA-Ca²⁺-Ströme früher nachweisbar als die HVA-Ca²⁺-Ströme.

Im Vergleich mit DRG-Vorläuferzellen (Abb. 22) waren sowohl der Na^+ - als auch der HVA- Ca^{2+} -Strom in kultivierten Ciliarvorläuferzellen früher vorhanden. Besonders beachtenswert ist, daß in Ciliarzellen der HVA- Ca^{2+} -Strom im Gegensatz zu DRG-Zellen nicht gleichzeitig mit, sondern deutlich nach dem Na^+ -Strom auftrat. Dies zeigt, daß bereits zu Beginn der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen zelltypspezifische Unterschiede im zeitlichen Auftreten der Ionenströme vorhanden sind.

3.4. Abhängigkeit der Amplitude von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in Ciliar- und DRG-Vorläuferzellen vom Differenzierungszustand

Um die Entwicklung der Amplitude von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in Ciliarvorläuferzellen zu verfolgen und mit der Entwicklung der Amplitude in DRG-Vorläuferzellen zu vergleichen, wurden die Amplituden der Ströme wie in 3.3.3. für 1-5 Stunden und 25-30 Stunden lang kultivierte Zellen bestimmt.

In Ciliarvorläuferzellen betrug die mittlere Amplitude des LVA- Ca^{2+} -Stroms nach 1-5 Stunden 8.2 ± 6.2 pA und nahm nach 25-30 Stunden in Kultur auf 13.3 ± 8.9 pA um das 1.6fache zu (Abb. 23B). Die mittlere Amplitude des HVA- Ca^{2+} -Stroms, der nach 1-5 Stunden in fast allen Zellen noch nicht nachweisbar war, lag nach 25-30 Stunden in Kultur bei 27.1 ± 20.3 pA (Abb. 23B). Die mittlere Amplitude des Na^+ -Stroms betrug nach 1-5 Stunden in Kultur 22.1 ± 17.2 pA und nahm nach 25-30 Stunden auf 94.5 ± 78.7 pA um das 4.3fache zu.

In DRG-Vorläuferzellen betrug die mittlere Amplitude des LVA- Ca^{2+} -Stroms 6.6 ± 5.0 pA bzw. 25.7 ± 10.7 pA (3.9fache Zunahme), die mittlere Amplitude des HVA- Ca^{2+} -Stroms nach 25-30 Stunden 33.6 ± 38.3 pA (Abb. 23A) und die mittlere Amplitude des Na^+ -Stroms 41.2 ± 55.2 pA.

Entsprechend dem früheren Auftreten von Na^+ -Strömen in Ciliarvorläuferzellen war die mittlere Amplitude des Na^+ -Stroms nach 1-5 Stunden und 25-30 Stunden in Ciliar-



Abb. 23: Vergleich der relativen Proportionen von LVA- und HVA- Ca^{2+} -Strömen.

A: Relative Proportionen in DRG-Vorläuferzellen (DRG).

B: Relative Proportionen in Ciliarvorläuferzellen (CG).

In 1-5 Stunden lang kultivierten Vorläuferzellen sind die LVA- Ca^{2+} -Ströme in beiden Präparaten gleich groß, während die HVA- Ca^{2+} -Ströme noch unter der Nachweisgrenze von 5 pA liegen. Nach 25-30 Stunden in Kultur sind die HVA- Ca^{2+} -Ströme in beiden Präparaten im Mittel nicht signifikant unterschiedlich, wogegen die LVA- Ca^{2+} -Ströme in DRG-Zellen größer sind als in Ciliarzellen. Dies deutet darauf hin, daß die Expression des LVA- Ca^{2+} -Stroms relativ zum HVA- Ca^{2+} -Strom in DRG-Vorläuferzellen stärker erfolgt als in Ciliarvorläuferzellen.

Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

vorläuferzellen signifikant größer als in DRG-Zellen (t-Test; p kleiner 0.01).

Die mittlere Amplitude des HVA- Ca^{2+} -Stroms in 25-30 Stunden kultivierten Ciliarvorläuferzellen unterschied sich nicht signifikant von der mittleren Amplitude des HVA- Ca^{2+} -Stroms in DRG-Zellen (t-Test; p größer 0.05). Die mittlere Amplitude der LVA- Ca^{2+} -Ströme war in beiden Zelltypen zunächst ebenfalls gleich (t-Test; p größer 0.05); jedoch war die mittlere Amplitude des LVA- Ca^{2+} -Stroms nach 25-30 Stunden in DRG-Zellen signifikant größer (t-Test; p kleiner 0.01). Sie nahm in Ciliarvorläuferzellen um das 1.6fache, in DRG-Zellen dagegen um das 3.9fache zu. Das Verhältnis zwischen HVA- Ca^{2+} - und LVA- Ca^{2+} -Strom betrug nach 25-30 Stunden bei Ciliarvorläufern 2.0; bei DRG-Vorläuferzellen dagegen nur 1.3.

Dies zeigt, daß die Expression der LVA- Ca^{2+} -Ströme, relativ zu den HVA- Ca^{2+} -Strömen, in DRG-Zellen stärker erfolgt als in Ciliarvorläuferzellen. Auch in weiter differenzierten DRG-Neuronen ist der LVA- Ca^{2+} -Strom relativ zum HVA- Ca^{2+} -Strom wesentlich deutlicher ausgeprägt als in weiter differenzierten Ciliarneuronen (siehe 3.5.). Dies spricht dafür, daß zelltypspezifische Unterschiede in den relativen Proportionen der 2 Typen von Ca^{2+} -Strömen bereits kurz nach Beginn der Expression von Ca^{2+} -Strömen vorhanden sind.

3.5. Ca^{2+} -Ströme in differenzierten Ciliarneuronen

Um zu untersuchen, ob auch in differenzierten Ciliar- und DRG-Neuronen zelltypspezifische Unterschiede bezüglich der 2 Typen von Ca^{2+} -Strömen vorhanden sind, wurden Ca^{2+} -Ströme in am 8. Embryonaltag isolierten Ciliarneuronen wie in 1.1. beschrieben gemessen.

E8-Ciliarneurone zeigten durch 0.5 mM Cd^{2+} blockierbare Ca^{2+} -Ströme, die bei Membranpotentialen positiver als -50 mV aktivierten und ihr Maximum bei -10 mV Membranpotential erreichten. Die bei -30 mV Membranpotential meßbaren Ca^{2+} -

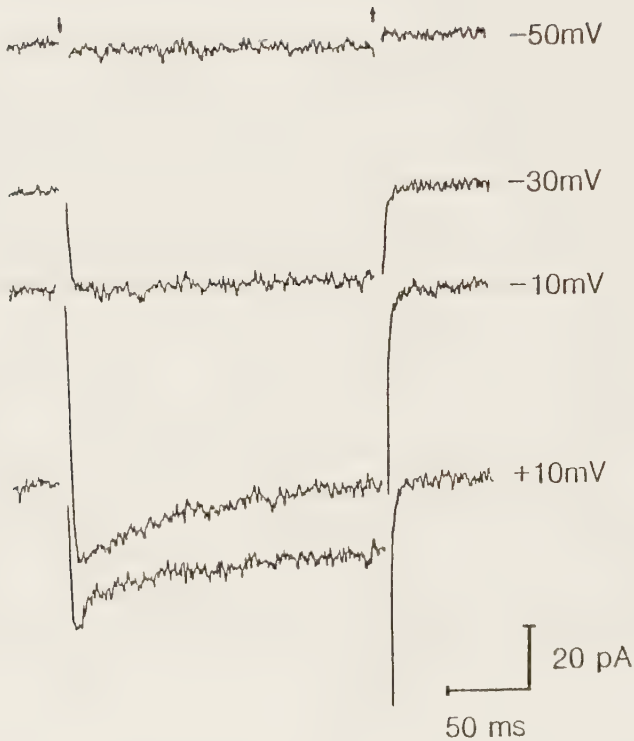


Abb. 24: Ca^{2+} -Ströme in differenzierten Ciliarneuronen.
Haltepotential: -80 mV. Extrazell. Lsg: 5Ca^{2+} .

In E8-Ciliarneuronen ist bei -50 mV Membranpotential noch fast kein Ca^{2+} -Strom vorhanden und die Ca^{2+} -Ströme zeigen bei -30 mV Membranpotential nur eine sehr geringe Inaktivierung. Dies spricht dafür, daß in Ciliarneuronen der Anteil der LVA- Ca^{2+} -Ströme am gesamten Ca^{2+} -Strom deutlich geringer ist als in DRG-Neuronen.

Ströme zeigten innerhalb von 200 ms nur eine sehr geringe Inaktivierung (Abb. 24). Im Gegensatz dazu zeigen DRG-Neurone bereits bei -50 mV einen deutlichen Ca^{2+} -Strom, der bei -30 mV Membranpotential fast vollständig innerhalb von 100 ms inaktiviert (Carbone und Lux, 1987a; Abb. 1).

Dies läßt darauf schließen, daß in DRG-Neuronen im Vergleich zu E8-Ciliarneuronen ein deutlich größerer Anteil des gesamten Ca^{2+} -Stroms durch LVA- Ca^{2+} -Kanäle fließt. Das weitaus deutlichere Vorhandensein von LVA- Ca^{2+} -Strömen in DRG-Neuronen stimmt mit der Beobachtung einer stärkeren Expression des LVA- Ca^{2+} -Stroms in differenzierenden DRG-Vorläuferzellen überein (siehe 3.4.).

3.6. Pharmakologische Blockierbarkeit und Haltepotentialabhängigkeit von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen in kultivierten Ciliarvorläuferzellen

Um festzustellen, ob Na^{+} - und Ca^{2+} -Ströme in differenzierenden Ciliarvorläuferzellen andere Eigenschaften besitzen als in DRG-Neuronen, wurde die pharmakologische Blockierbarkeit und Haltepotentialabhängigkeit von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen untersucht.

3.6.1. TTX-Blockierbarkeit früher Na^{+} -Ströme

Wie in DRG-Zellen waren die in differenzierenden Ciliarvorläuferzellen meßbaren Na^{+} -Ströme durch extrazellulär 3×10^{-6} M TTX vollständig blockierbar (Abb. 25).

3.6.2. Cd^{2+} -Blockierbarkeit und Haltepotentialabhängigkeit früher Ca^{2+} -Ströme

Die in differenzierenden Ciliarvorläuferzellen meßbaren Ca^{2+} -Ströme waren wie in DRG-Zellen durch 0.5 mM Cd^{2+} zu allen Zeitpunkten in Kultur blockierbar (Abb. 26A,B). Durch extrazelluläre Zugabe des organischen Ca^{2+} -Kanalblockers Verapamil konnte selektiv die nach 200 ms persistierende HVA-

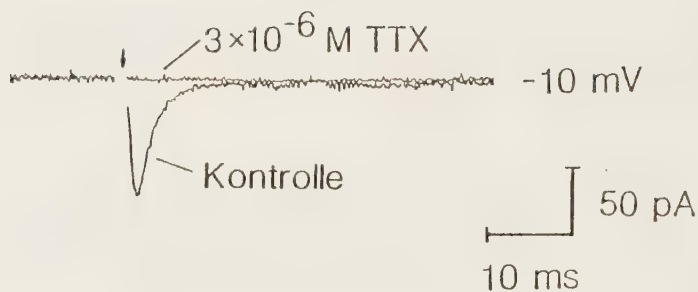


Abb. 25: TTX-Blockierbarkeit früher Na⁺-Ströme.

Haltepotential: -80 mV. Extrazell. Lsg: 120Na⁺.

Die in Ciliarvorläuferzellen meßbaren Na⁺-Ströme waren vollständig durch TTX blockierbar.

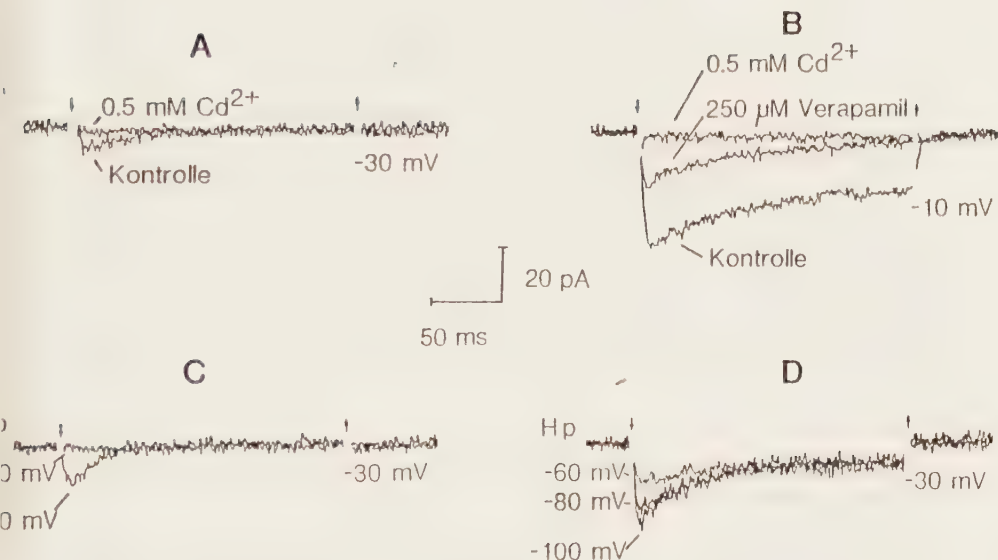


Abb. 26:

Extrazell. Lsg: 5Ca^{2+} .

A: Die nach 1-5 Stunden in Ciliarvorläuferzellen meßbaren LVA- Ca^{2+} -Ströme waren durch 0.5 mM Cd^{2+} blockierbar. Haltepotential: -80 mV .

B: Die nach 25-30 Stunden in Kultur in Ciliarzellen vorhandenen LVA- und HVA- Ca^{2+} -Ströme waren durch 0.5 mM Cd^{2+} blockierbar. Die persistierende Ca^{2+} -Stromkomponente (HVA) konnte durch Verapamil selektiv blockiert werden. Haltepotential: -80 mV .

C: Die LVA- Ca^{2+} -Ströme in 1-5 Stunden lang kultivierten Ciliarvorläuferzellen waren nur von einem Haltepotential negativer als -50 mV aus aktivierbar.

D: Nach 25-30 Stunden in Kultur zeigte die inaktivierende Ca^{2+} -Stromkomponente (LVA) eine deutlichere Haltepotentialabhängigkeit als die persistierende Komponente (HVA).

Ca^{2+} -Stromkomponente blockiert werden (Abb. 26B). Der HVA- Ca^{2+} -Strom erwies sich daher, wie in DRG-Neuronen (Boll und Lux, 1985), als sensitiver gegenüber Verapamil als der LVA- Ca^{2+} -Strom. Dies zeigt weiterhin, daß auch bei Ciliarvorläuferzellen nach 25-30 Stunden in Kultur der LVA- Ca^{2+} -Strom die in 200 ms inaktivierende Komponente und der HVA- Ca^{2+} -Strom die nach 200 ms persistierende Komponente bei -10 mV Membranpotential darstellt (siehe 3.3.3.).

Die in Ciliarvorläuferzellen meßbaren LVA- Ca^{2+} -Ströme waren, wie in DRG-Neuronen, bei einer Reduktion des Haltepotentials von -80 auf -50 mV nicht mehr beobachtbar (Abb. 26C). Die HVA- Ca^{2+} -Ströme zeigten dagegen, ähnlich wie in DRG-Neuronen, bei einer Reduktion des Haltepotentials von -100 auf -60 mV nur eine geringe Abnahme der Amplitude (Abb. 26D).

4. Expression von spannungsabhängigen Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen in embryonalen Blutegelneuronen

4.1. Morphologische Entwicklung des Blutegel-ZNS und Definition von Entwicklungsstadien

Die morphologische Ausbildung des Blutegel-ZNS erfolgt während mehrerer Tage der Embryogenese und bietet eine einfache und verlässliche Methode zur Abgrenzung verschiedener Entwicklungsstadien. Die segmental sich wiederholenden Ganglien, aus denen das ZNS von *Hirudo medicinalis* aufgebaut ist, entstehen während der Embryogenese aus einem Teil der Zellen der Germinalplatte. Die Zellen der Germinalplatte wiederum sind Abkömmlinge von 5 Paar Stammzellen, den Teloblasten (Fernandez und Stent, 1982; Weisblat, 1985).

Die Entwicklung der in Kokons enthaltenen Blutegelembryonen wurde bei einer Temperatur von 23-24°C beobachtet und der Tag der Kokonablage als 1.Embryonaltag definiert. Im frühesten Stadium der ZNS-Entwicklung (am 6.Embryonaltag; E6) waren noch keine Ganglien sichtbar. Die Teloblasten bildeten das kaudale Ende der Germinalplatte. Der

kaudale Teil der Germinalplatte bestand aus den Tochterzellen der Teloblasten, die in parallelen Zellreihen angeordnet waren. Im rostralen Teil verbreiterte sich die Germinalplatte durch weitere Proliferation der Tochterzellen der Teloblasten (Abb. 27A). Am 7.Embryonaltag (E7; Abb. 27B) hatten sich am rostralen Ende der Germinalplatte die ersten Ganglien gebildet. Am kaudalen Ende waren nach wie vor die Teloblasten und ihre Tochterzellen sichtbar. Der Blutegelembryo wies einen rostro-kaudalen Entwicklungsgradienten auf, wobei die Zellen rostral gelegener Segmente in ihrer Entwicklung weiter fortgeschritten waren, als die Zellen kaudaler Segmente. Vom 7.Embryonaltag an konnten Ganglien aus dem Embryo isoliert und die in ihnen enthaltenen Zellen daher eindeutig als unreife Neurone identifiziert werden. Am 8.Embryonaltag (E8; Abb. 27C) waren im rostralen Teil des Embryos 20-25 Ganglien vorhanden, während am kaudalen Ende noch immer Teloblasten sichtbar waren. Die Teloblasten und ihre in Zellreihen angeordneten Tochterzellen verschwanden am 9.Embryonaltag (E9; Abb. 27D). In diesem Stadium waren bereits fast alle 32 Ganglien ausgebildet. Einen Tag später (E10; Abb. 27E) begann das Schwanzganglion sich durch eine Einkerbung von der übrigen Ganglienkette abzusetzen; der Schwanzsauger war in diesem Stadium noch nicht vorhanden. Am 11.Embryonaltag (E11; Abb. 27F) begann die Ausbildung des Schwanzsaugers, der am 12.Embryonaltag (E12; Abb. 27G) deutlich ausgebildet war.

Werden die Ganglien in einem solchen definierten Entwicklungsstadium isoliert, so können die in den Ganglien enthaltenen Neurone trotzdem aus zwei Gründen eine erhebliche Variabilität im Differenzierungszustand aufweisen:

i.) Aufgrund des rostro-kaudalen Entwicklungsgradienten sind Neurone eines bestimmten Zelltyps aus den rostralen Ganglien weiter differenziert als Zellen des gleichen Zelltyps aus den kaudalen Ganglien.

ii.) Neurone verschiedenen Zelltyps innerhalb eines Ganglions können einen unterschiedlichen Zeitverlauf der Differenzierung besitzen.

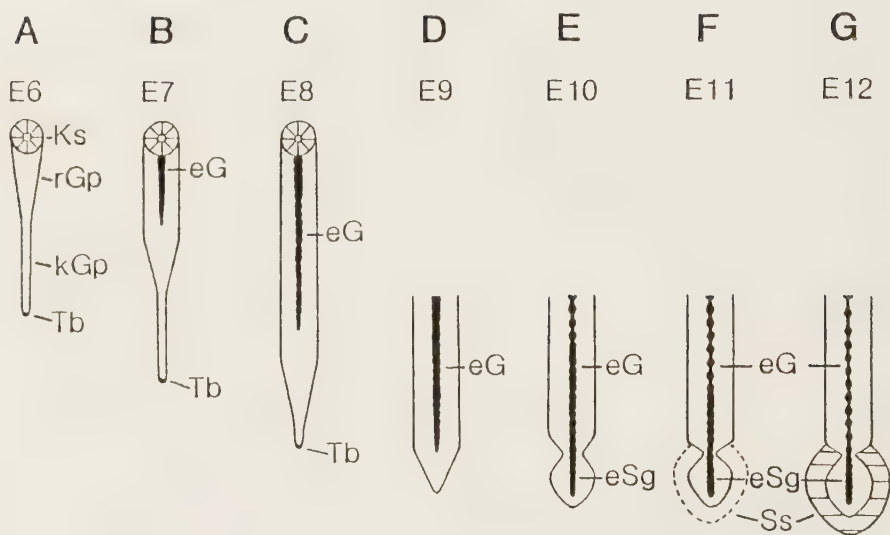


Abb. 27: Definition verschiedener Entwicklungsstadien des Blutegelembryos.

Aufgrund der morphologischen Entwicklung des ZNS konnten verschiedene Entwicklungsstadien abgegrenzt werden (siehe Text).

Ks: embryonaler Kopfsauger. rGp: rostrale Gerninalplatte. kGp: kaudale Gerninalplatte. Tb: Teloblasten. eG: embryonale Ganglien. eSg: embryonales Schwanzganglion. Ss: embryonaler Schwanzsauger.

Aus diesen Gründen ist es notwendig, die Variabilität im Differenzierungszustand innerhalb eines Entwicklungsstadiums möglichst stark zu begrenzen. Die zu untersuchenden embryonalen Neurone sollten daher möglichst nur einem Zelltyp angehören und aus den am weitesten rostral gelegenen segmentalen Ganglien stammen.

4.2. Morphologische Differenzierung embryonaler Retzius-Zellen

Adulte segmentale Blutegelganglien weisen je 1 Paar medial gelegener Neurone auf, die sich von den übrigen Neuronen allein durch ihre enorme Größe (80-100 μm Durchmesser) unterscheiden lassen (Abb. 2). Diese, nach G. Retzius benannten Zellen enthalten als Neurotransmitter Serotonin und können aufgrund ihres Serotoningehaltes einschließlich ihrer Neurite histologisch dargestellt werden (Henderson, 1982; Lent et al., 1983). Darüberhinaus sind Retzius-Zellen in der Lage, somatische Aktionspotentiale charakteristischer Form zu erzeugen (Muller et al., 1981). Retzius-Zellen erscheinen aus drei Gründen als der geeignetste Neuronentyp im Blutegel, um die embryonale Expression spannungsabhängiger Ionenkanäle zu untersuchen:

i.) sie sind zumindest im adulten Ganglion durch ein einfaches morphologisches Kriterium, ihre Größe, in vitalem Zustand identifizierbar.

ii.) ihre Fähigkeit, somatische Aktionspotentiale zu erzeugen, erlaubt es, spannungsabhängige Ionenkanäle an isolierten Zellsomata unter kontrollierten Membranpotentialbedingungen zu studieren.

iii.) die histologische Darstellbarkeit ihrer Neurite bietet die Möglichkeit, die Expression von Ionenkanälen zeitlich mit dem Neuritenwachstum zu korrelieren.

Embryonale Retzius-Zellen können nach Präinkubation in Serotonin mit Hilfe serotoninspezifischer Antikörper einschließlich ihrer Neurite dargestellt werden (Glover und Mason, 1986). Darüberhinaus besitzen embryonale Retzius-

Zellen zwischen E7 und E12 die Fähigkeit extern appliziertes Dopamin aufzunehmen und zu speichern. Das aufgenommene und gespeicherte Dopamin ergibt nach Inkubation mit Glyoxylsäure eine fluoreszierende Verbindung. Dies ermöglicht es, embryonale Retzius-Zellen auf einfache Weise darzustellen (Dietzel und Gottmann, 1988).

An E7 waren die embryonalen Retzius-Zellen in den am weitesten rostral gelegenen Ganglien auf diese Weise bereits anfärbbar, während sie in den kaudal gelegenen Ganglien noch nicht dargestellt werden konnten. Der Durchmesser des Zellsomas betrug nach der Färbeprozedur ca. 5 μm und die vom Zellsoma ausgehenden Neurite waren noch sehr kurz (Abb. 28A). Sie erreichten in peripherer Richtung noch nicht die Grenze des Ganglions (Abb. 29A) und waren auch noch nicht in die die Ganglien verbindenden Konnektive eingewachsen (Abb. 28A). Embryonale Retzius-Zellen zeigten bereits kurz nach Beginn des Neuritenwachstums das auch für adulte Retzius-Zellen (Glover und Mason, 1986) charakteristische Verzweigungsmuster.

1 bis 2 Tage später (E8-E9) hatte der Somadurchmesser der embryonalen Retzius-Zellen in den rostral gelegenen Ganglien bereits deutlich zugenommen (Abb. 28B). Ihre Neurite waren nun deutlich in die Konnektive eingewachsen und erreichten die benachbarten Ganglien (Abb. 28B). Auch in peripherer Richtung waren die Neurite deutlich weiter ausgewachsen und reichten nun weit über die Grenzen des Ganglions hinaus (Abb. 29B).

An E9 hatte der Somadurchmesser auf ca. 10 μm (nach der Färbeprozedur) zugenommen (Abb. 28C) und erreichte an E11 ca. 15-20 μm (Abb. 28D). Von E9 an waren neben den embryonalen Retzius-Zellen 1-2 weitere Neuronenpaare in den rostral gelegenen Ganglien aufgrund ihrer Dopaminaufnahme angefärbt. Der Somadurchmesser der embryonalen Retzius-Zellen war deutlich größer als der Somadurchmesser der zusätzlich angefärbten Neuronenpaare (Abb. 28C), die die Vorläufer anderer serotoninhaltiger Neuronentypen darstellen (Dietzel und Gottmann, 1988).

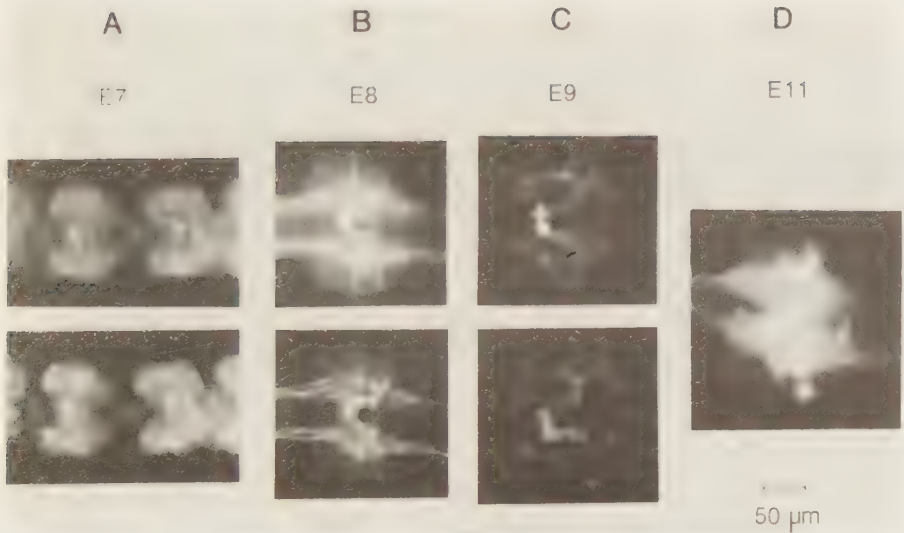


Abb. 28: Morphologische Entwicklung embryonaler Retzius-Zellen.

Glyoxylsäurefärbung von embryonalen Retzius-Zellen nach Präinkubation in Dopamin. Die Ganglienkeette wurde vor der Färbeprozedur aus dem Embryo isoliert.

A: An E7 besaßen die Retzius-Zellen nur sehr kurze Neurite.
 B: An E8 war der Somadurchmesser der Retzius-Zellen deutlich größer und die Neurite waren deutlich weiter ausgewachsen.

C: An E9 waren die Retzius-Zellen deutlich größer als die nun ebenfalls gefärbten Vorläufer anderer serotoninerger Neurone.

D: Retzius-Zellen an E11.

Es ist jeweils eines der 4 am weitesten rostral gelegenen, segmentalen Ganglien abgebildet, wobei das rostrale Ende der Ganglien nach links orientiert ist. A, B und C zeigen jeweils die gleichen Ganglien in verschiedenen Schärferebenen.

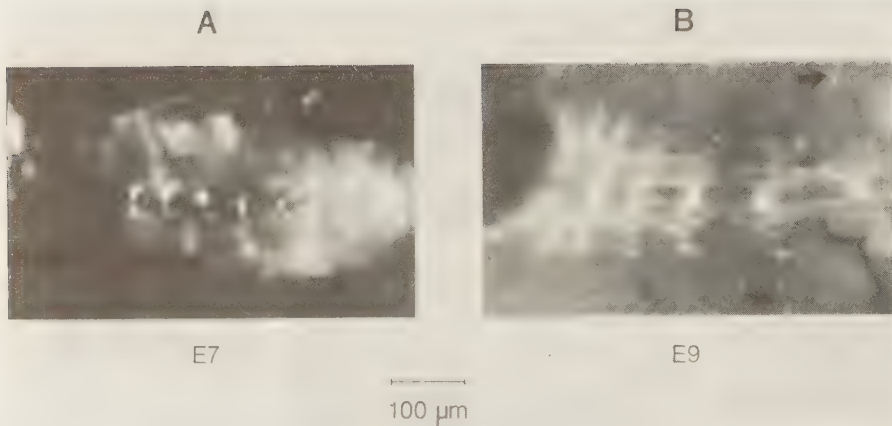


Abb. 29: Morphologische Entwicklung embryonaler Retzius-Zellen.

Glyoxylsäurefärbung embryonaler Retzius-Zellen nach Präinkubation in Dopamin. Die gesamte Germinalplatte wurde der Färbeprozedur unterzogen.

A: An E7 begann in den rostralsten Ganglien das Neuritenwachstum der Retzius-Zellen.

B: An E9 waren die Neurite der Retzius-Zellen in die, die Ganglien verbindenden Konnektive, eingewachsen und sie waren in peripherer Richtung deutlich weiter ausgewachsen (Pfeile).

Dargestellt sind die 4 Ganglien, die zum Kopfganglion fusionieren, und die ersten segmentalen Ganglien. Das rostrale Ende des Embryos ist nach links orientiert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die embryonalen Retzius-Zellen spätestens an E9 deutlich größer waren als andere embryonale Neuronentypen und eine Größenzunahme der embryonalen Retzius-Zellen bereits an E8 deutlich sichtbar war. Das Auswachsen der Neurite embryonaler Retzius-Zellen begann mit der morphologischen Ausbildung der Ganglien an E7 und schritt sehr rasch voran.

Der rostro-kaudale Entwicklungsgradient im Hirudoembryo war an E9 deutlich am Differenzierungszustand der embryonalen Retzius-Zellen sichtbar. Während in den ersten segmentalen Ganglien die Retzius-Zellen nach der Glyoxylsäurefärbung ca. 10 μm groß waren (Abb. 30A), war der Somadurchmesser embryonaler Retzius-Zellen im 19. segmentalen Ganglion deutlich geringer (Abb. 30C). Bis zum 10. segmentalen Ganglion (Abb. 30B) war der Somadurchmesser der embryonalen Retzius-Zellen deutlich größer (ca. 2x) als der Somadurchmesser rostraler Retzius-Zellen an E7 (Abb. 28A). Die in den ersten 10 segmentalen Ganglien an E9 enthaltenen Retzius-Zellen besaßen mindestens den Somadurchmesser der rostralen Retzius-Zellen an E8 (Abb. 28B). In den ersten 10 segmentalen Ganglien an E9 waren daher keine kleinen (Durchmesser wie an E7) Retzius-Zellen mehr enthalten.

4.3. Entwicklung von Größenunterschieden zwischen embryonalen Neuronen verschiedenen Zelltyps

Segmentale embryonale Blutegelganglien konnten vom 7. Embryonaltag an isoliert und nach Inkubation in Kollagenase/Dispase mechanisch zu Einzelzellen dissoziiert werden. Neben wenigen nichtneuronalen Zellen fanden sich in solchen Kulturen dissoziierter embryonaler Ganglien hauptsächlich Zellen mit neuronaler Morphologie. Diese embryonalen Neurone besaßen phasenhelle Somata mit glatter Oberfläche und sie zeigten einen phasendunklen Rest ihrer Neurite (Abb. 31). Wurden pro Kulturschale die segmentalen Ganglien von 3 Embryonen dissoziiert, so fanden sich pro

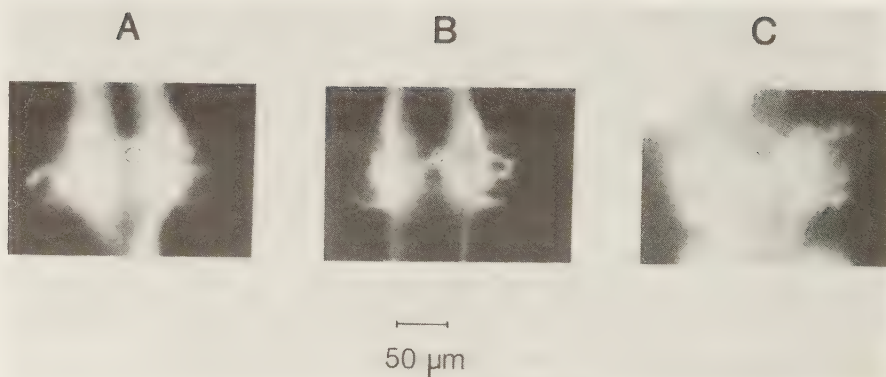


Abb. 30: Rostro-kaudaler Entwicklungsgradient der Retzius-Zellen an E9.

Glyoxylsäurefärbung embryonaler Retzius-Zellen nach Präinkubation in Dopamin. Die Ganglienkeite wurde vor der Färbeprozedur aus dem Embryo isoliert.

A: 2.segmentales Ganglion eines E9-Embryos.

B: 10.segmentales Ganglion des gleichen Embryos wie in A.

C: 19.segmentales Ganglion des gleichen Embryos wie in A.

Aufgrund des rostro-kaudalen Entwicklungsgradienten des Blutgelembryos waren die Retzius-Zellen in den rostralen Ganglien deutlich größer als in den kaudalen Ganglien.

Das rostrale Ende der Ganglien ist nach oben orientiert.

Die Zellsomata der Retzius-Zellen sind zur Verdeutlichung markiert.

Kulturschale mehrere tausend Zellen mit neuronaler Morphologie.

Wurden segmentale Ganglien an E7 isoliert und dissoziiert, so ließen sich an den frisch dissoziierten Einzelzellen keine auffälligen Größenunterschiede beobachten. Die größten Neurone in solchen Kulturen besaßen einen Durchmesser von 10-15 μm (Abb. 31A). Wurden dagegen segmentale Ganglien an E8 dissoziiert, so fanden sich unter mehreren tausend Neuronen etwa 20-30 Neurone, die auffällig größer als alle übrigen Neurone waren (Abb. 31B). Diese Zellen zeigten mindestens den 2fachen Somadurchmesser der nächstkleineren Neurone und der Somadurchmesser betrug ca. 20 μm . Ähnliche Größenunterschiede fanden sich auch an E9, E10 und E11, jedoch betrug der Somadurchmesser der auffällig großen Zellen an E11 bereits 25-30 μm (Abb. 31C).

Da die verschiedenen Neuronentypen im adulten Blutegelganglion in Abhängigkeit vom Zelltyp sehr unterschiedlich große Somata besitzen (Abb. 2), bietet das Vorhandensein auffälliger Größenunterschiede zwischen embryonalen Neuronen die Möglichkeit durch Selektion auffällig großer Zellen die Variabilität hinsichtlich des Zelltyps stark einzuschränken. Auffällig größere embryonale Neurone traten in enger zeitlicher Korrelation mit der Größenzunahme embryonaler Retzius-Zellen auf (an E8). Weiterhin war die Anzahl auffällig großer Neurone pro Embryo so gering, daß es wahrscheinlich erscheint, daß sie nur einem Zelltyp angehörten. Darüberhinaus sind die Retzius-Zellen im adulten Blutegelganglion die weitaus größten Neurone und sie waren auch in embryonalen Ganglien (an E9, siehe 4.2.) deutlich größer als andere Zelltypen. Aus diesen Gründen scheint es wahrscheinlich, daß die Population auffällig großer embryonaler Neurone zumindest zum Teil aus embryonalen Retzius-Zellen bestand. Der Somadurchmesser embryonaler Retzius-Zellen, die aufgrund ihrer Fähigkeit zur Dopaminaufnahme gefärbt werden konnten, war nach der Färbeprozedur etwas geringer als der Somadurchmesser der auffällig großen embryonalen Neurone (siehe Kap. 4.2.).

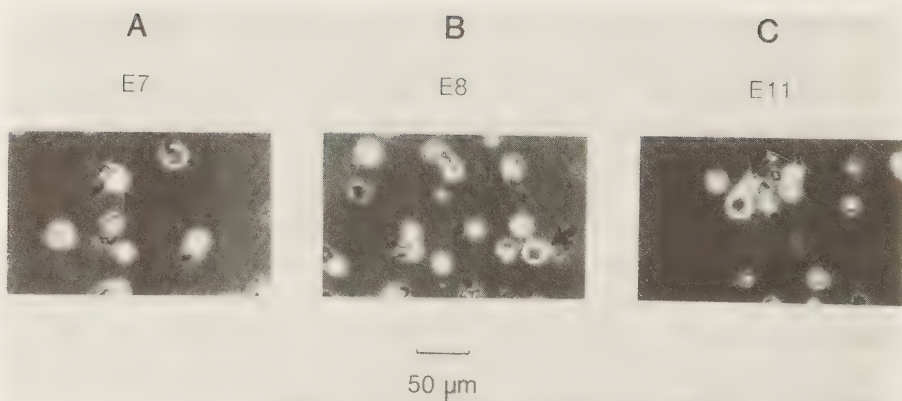


Abb. 31: Entwicklung von Größenunterschieden zwischen embryonalen Blutegelneuronen verschiedenen Zelltyps.

A: An E7 zeigten alle embryonalen Neurone nach der Dissoziation einen Somadurchmesser von ca. 10 µm.

B: An E8 waren erstmals einige auffällig größere Neurone vorhanden (Pfeil), die etwa den zweifachen Somadurchmesser der übrigen Neurone besaßen.

C: An E11 erreichten die auffällig großen Neurone einen Somadurchmesser von bis zu 30 µm (Pfeil).

Dieser Unterschied kann jedoch leicht dadurch erklärt werden, daß die Färbeprozedur eine Trocknung und damit eine Schrumpfung der embryonalen Zellen beinhaltet.

Die Selektion auffällig großer embryonaler Zellen bietet neben der Einschränkung der Zelltypvariabilität die Möglichkeit, die durch den rostro-kaudalen Entwicklungsgradienten bedingte Variabilität im Differenzierungszustand ebenfalls stark einzuschränken. Dies ist möglich, da während der Entwicklung des ZNS die embryonalen Retzius-Zellen in den anterioren Ganglien deutlich größer waren, als embryonale Retzius-Zellen in den posterioren Ganglien (Abb. 30).

Da frisch dissoziierte embryonale Neurone so gut wie keine Neurite mehr besaßen, eigneten sie sich besonders für die Messung spannungsabhängiger Ionenströme mit Hilfe der Ganzzellaufleitung der patch-clamp-Technik unter voltage-clamp-Bedingungen.

4.4. Regeneration dissoziierter embryonaler Neurone in Kultur

Wurden dissoziierte embryonale Neurone auf Concanavalin A beschichteten Kulturschalen in serumhaltigem Medium kultiviert, so war bereits nach 2 Tagen in Kultur eine deutliche Regeneration der Neurite beobachtbar, die während der nächsten Tage fortschritt (Abb. 32). Dies zeigt, daß dissoziierte embryonale Neurone weder durch die enzymatische Behandlung, noch durch die Dissoziationsprozedur in ihrer Lebensfähigkeit beeinträchtigt waren.

4.5. Spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme in embryonalen Neuronen am 9. Embryonaltag

Wurden embryonale Ganglien an E9 dissoziiert, so fanden sich neben einer Vielzahl ca. 10 μm großer Neurone einige wenige auffällig größere Neurone (Durchmesser 20-25 μm). Das Vorhandensein und die Eigenschaften spannungsabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme wurden mit Hilfe der Ganzzellaufleitung der patch-clamp-Technik in beiden Populationen an E9 untersucht.

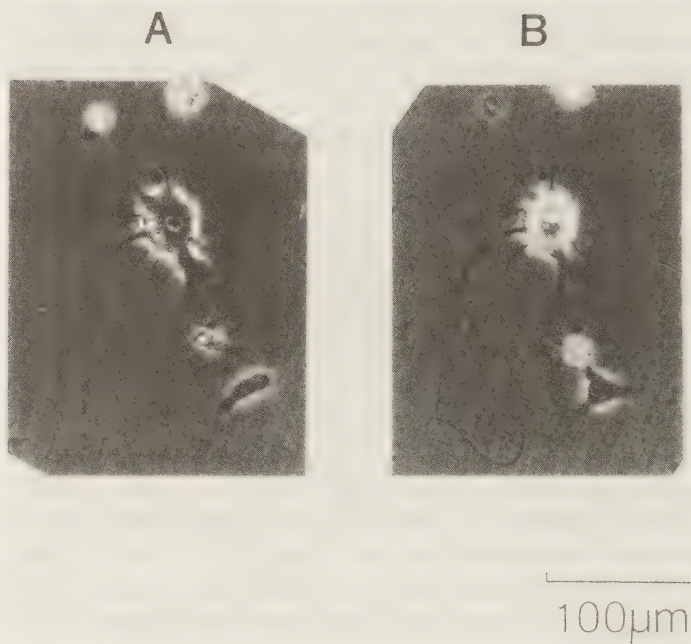


Abb. 32: Dissoziierte embryonale Bluteigelneurone in Kultur.
In Kultur regenerierten an E10 dissoziierte embryonale Neurone ihre Neuriten.

A: Neuron nach 2 Tagen in Kultur.

B: Gleiche Zelle wie in A nach 7 Tagen in Kultur.

4.5.1. Spannungsabhängige Na⁺-Ströme

Um die Na⁺-Ströme zu isolieren, wurden die intra- und extrazellulären Bedingungen so gewählt, daß spannungsabhängige Ca²⁺- und K⁺-Ströme blockiert waren. Ca²⁺-Ströme wurden blockiert durch Verwendung einer Ca²⁺-freien und 0.5 mM Cd²⁺ (blockiert Ca²⁺-Ströme in embryonalen Blutegelneuronen, siehe 4.5.2.) enthaltenden extrazellulären Lösung. K⁺-Ströme wurden blockiert durch die Kaliumkanalblocker TEA und 4-AP extrazellulär, TEA intrazellulär und die Verwendung einer K⁺-freien intrazellulären Lösung. Die extrazelluläre Lösung enthielt 120 mM Na⁺, während die intrazelluläre Lösung Na⁺-frei war. Das Haltepotential betrug -50 mV. Stärker negative Haltepotentiale konnten nur für kurze Zeit (einige Sekunden) appliziert werden, da ansonsten eine starke Zunahme der Leckströme erfolgte.

4.5.1.1. Na⁺-Ströme in auffällig großen embryonalen Neuronen

Spannungsabhängige Na⁺-Ströme konnten in 100% der untersuchten großen Neurone (n=10) an E9 beobachtet werden (Abb. 33A). Diese Na⁺-Ströme aktivierten bei einem Membranpotential von -20 mV und erreichten ihr Maximum bei -10 bis 0 mV Membranpotential (Abb. 33B). Sie inaktivierten bei 0 mV Membranpotential innerhalb von 10 ms und die "time-to-peak" nahm mit zunehmender Depolarisation ab (Abb. 33A). Wurde das extrazelluläre Na⁺ durch Cholin ersetzt, so waren diese Na⁺-Ströme vollständig blockiert (Abb. 34A). Die extrazelluläre Applikation von 3×10^{-6} M TTX zeigte im Gegensatz zu den TTX-sensitiven Na⁺-Strömen in Hühnchenneuronen keinen Effekt (Abb. 34B).

4.5.1.2. Na⁺-Ströme in kleinen embryonalen Neuronen

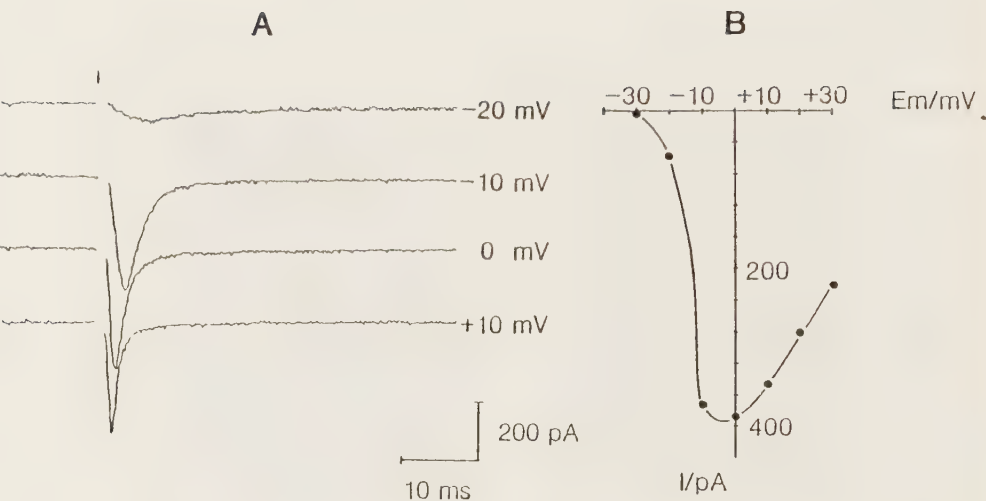


Abb. 33: Na^+ -Ströme in auffällig großen Neuronen an E9.
Haltepotential: -50 mV. Extrazell. Lsg: 120Na^+ .

A: An E9 waren in auffällig großen Neuronen spannungsabhängige Na^+ -Ströme nachweisbar, die bei einem Membranpotential von -20 mV aktivierten und ihre maximale Amplitude bei -10 bis 0 mV Membranpotential erreichten.

B: Strom-Spannungscharakteristik der in A gezeigten Na^+ -Ströme.

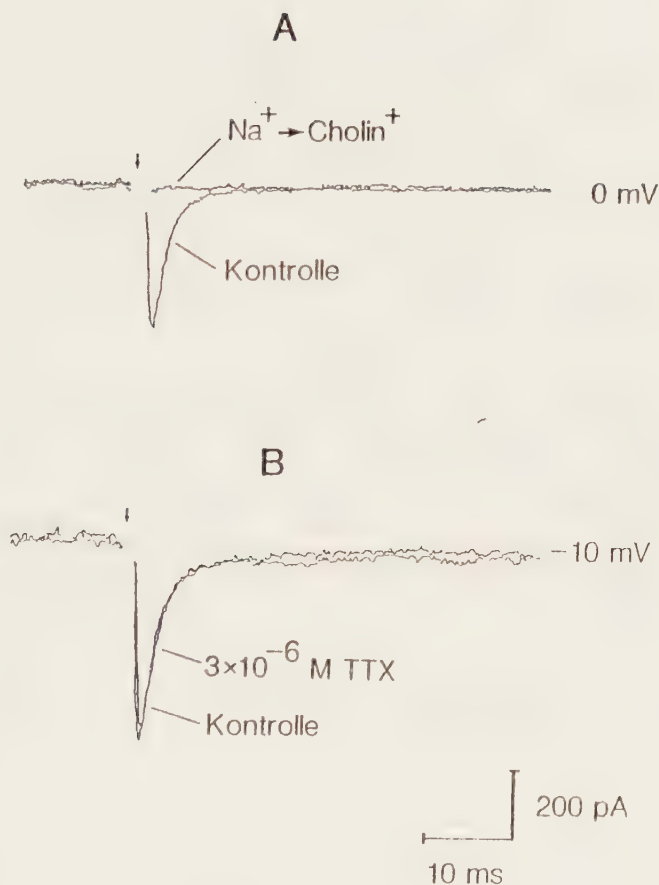


Abb. 34: Na⁺-Ströme in auffällig großen Neuronen an E9.
 Haltepotential: -50 mV. Extrazell. Lsg.: 120Na⁺.
 A: Die Na⁺-Ströme waren nach Ersetzen des extrazellulären
 Na⁺ durch Cholin blockiert.
 B: Die Na⁺-Ströme waren nicht blockierbar durch
 extrazelluläre Zugabe von 3×10^{-6} M TTX.

Um die durch den rostro-kaudalen Entwicklungsgradienten bedingte Variabilität im Differenzierungszustand zu reduzieren, insbesondere, um kleine embryonale Retzius-Zellen auszuschließen, wurden für Messungen an kleinen embryonalen Neuronen nur die ersten 10 segmentalen Ganglien an E9 dissoziiert (siehe Abb. 30). Unter diesen Bedingungen konnte in keinem der untersuchten kleinen Neurone ($n=10$) ein spannungsabhängiger Na^+ -Strom nachgewiesen werden (Abb. 35). Dies spricht dafür, daß bereits am 9.Embryonaltag zelltypspezifische Unterschiede bezüglich somatischer Ionenkanäle ausgebildet sind.

4.5.2. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Ströme

Um Ca^{2+} -Ströme zu isolieren, wurden die intra- und extrazellulären Bedingungen so gewählt, daß spannungsabhängige Na^+ - und K^+ -Ströme blockiert waren. Na^+ -Ströme wurden durch Verwendung einer Na^+ -freien extrazellulären Lösung und K^+ -Ströme wie bei der Isolierung von Na^+ -Strömen blockiert. Um den für Ca^{2+} -Ströme typischen run-down (siehe 1.1.) so weit wie möglich zu reduzieren, enthielt die intrazelluläre Lösung ATP, cAMP und Mg^{2+} . Die extrazelluläre Lösung enthielt in den meisten Experimenten 50 mM Ca^{2+} . Das Haltepotential lag bei den meisten Versuchen bei -50 mV.

4.5.2.1. Ca^{2+} -Ströme in auffällig großen embryonalen Neuronen

Die an E9 in großen embryonalen Neuronen in 5 mM Ca^{2+} meßbaren Ca^{2+} -Ströme aktivierten bei einem Membranpotential von -20 mV und erreichten ihr Maximum bei 0 mV Membranpotential (Abb. 36C). Sie inaktivierten bei 0 mV Membranpotential fast vollständig innerhalb von 300 ms (Abb. 36A). In 50 mM Ca^{2+} zeigten die Ca^{2+} -Ströme die 2-3fache Amplitude (Abb. 36C), aktivierten bei 0 mV Membranpotential, erreichten ihr Maximum bei +20 bis +30 mV Membranpotential (Abb. 36C) und inaktivierten ebenfalls fast vollständig innerhalb von

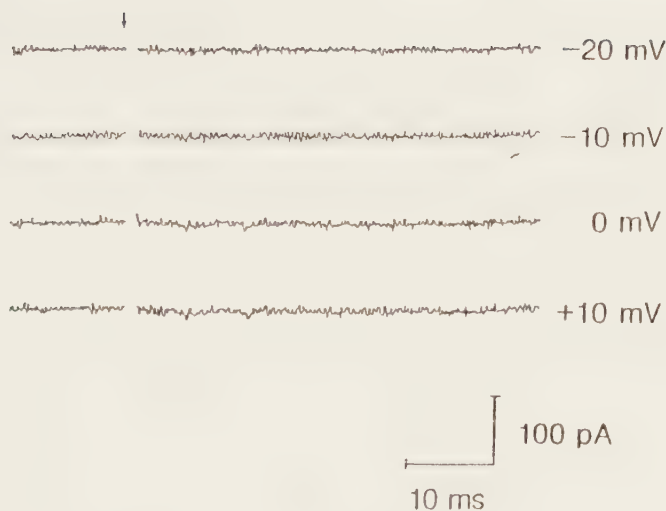


Abb. 35:

In kleinen embryonalen Neuronen an E9 konnten keine spannungsabhängigen Na^+ -Ströme nachgewiesen werden. Haltepotential: -50 mV. Extrazell. Lsg.: 120Na^+ .

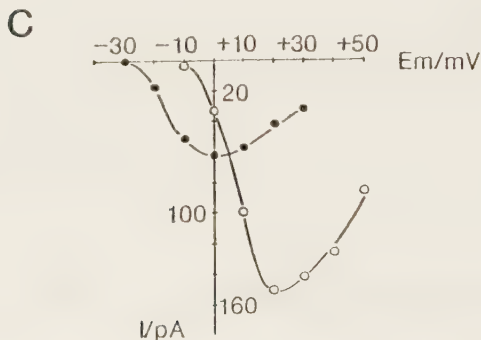
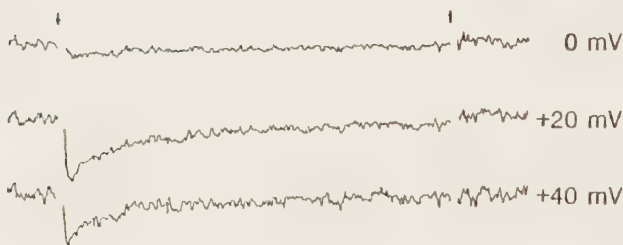
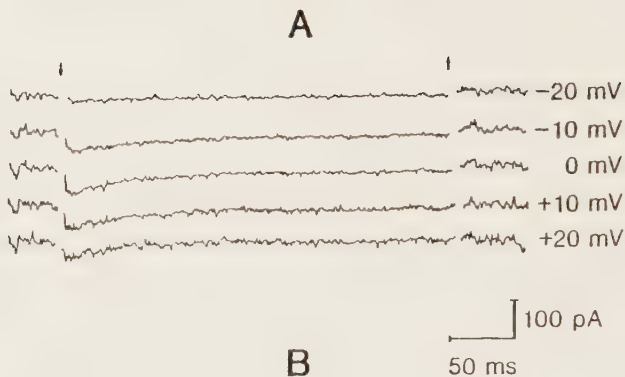


Abb. 36: Ca^{2+} -Ströme in auffällig großen Neuronen an E9.
Haltepotential: -50 mV.

A: Extrazell. Lsg.: 5Ca^{2+} . In auffällig großen embryonalen Neuronen an E9 waren spannungsabhängige Ca^{2+} -Ströme nachweisbar, die bei -20 mV aktivierten, ihre maximale Amplitude bei 0 mV Membranpotential erreichten und innerhalb von 300 ms fast vollständig inaktivierten.

B: Extrazell. Lsg.: 50Ca^{2+} . In 50 mM Ca^{2+} erreichten die Ca^{2+} -Ströme die 2-3fache Amplitude. Gleiche Zelle wie in A.

C: Strom-Spannungscharakteristik der in A und B gezeigten Ca^{2+} -Ströme. Die Verschiebung der Strom-Spannungscharakteristik zu positiveren Membranpotentialen kann durch die Veränderung der Oberflächenladung der Zelle erklärt werden.

● : 5 mM Ca^{2+} .

○ : 50 mM Ca^{2+} .

300 ms (Abb. 36B). Die Verschiebung der Strom-Spannungscharakteristik zu positiveren Membranpotentialen in erhöhtem extrazellulärem Ca^{2+} kann durch die Veränderung der Oberflächenladung der Zelle erklärt werden (Wilson et al., 1983). In 50 mM Ca^{2+} zeigten 100% der untersuchten großen Neurone ($n=10$) deutliche Ca^{2+} -Ströme. Diese Ca^{2+} -Ströme waren vollständig durch 0.5 mM Cd^{2+} blockierbar (Abb. 37A). Im Gegensatz zu Hühnchenneuronen konnte bei einer Erniedrigung des Haltepotentials von -50 auf -80 mV (untersucht bei Membranpotentialen von -20, 0, +20 mV) keine Zunahme des Ca^{2+} -Stroms gemessen werden (Abb. 37B). Die Amplitude der Ca^{2+} -Ströme war bei -30 bis -20 mV Haltepotential deutlich reduziert und bei -10 mV Haltepotential annähernd Null. Im Gegensatz zu Hühnchenneuronen ließ sich daher bei embryonalen Blutegelneuronen kein durch Erniedrigung des Haltepotentials meßbarer, zusätzlicher Ca^{2+} -Strom nachweisen. Die meßbaren Ca^{2+} -Ströme zeigten eine HVA-ähnliche Spannungsabhängigkeit der Aktivierung; sie inaktivierten jedoch unter vergleichbaren Bedingungen sehr viel schneller als HVA- Ca^{2+} -Ströme.

4.5.2.2. Ca^{2+} -Ströme in kleinen embryonalen Neuronen

Für Messungen an kleinen embryonalen Neuronen wurden wiederum nur die ersten 10 segmentalen Ganglien an E9 dissoziiert. Unter diesen Bedingungen konnten in 43% der kleinen Neurone ($n=7$) Ca^{2+} -Ströme mit ähnlicher Kinetik und Spannungsabhängigkeit wie in großen embryonalen Neuronen nachgewiesen werden.

4.6. Zeitliche Relation des Auftretens von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen zum Beginn des Neuritenwachstums

Das Neuritenwachstum embryonaler Retzius-Zellen hat an E7 in den am weitesten rostral gelegenen Ganglien gerade begonnen (Abb. 29A) und schreitet bis E9 rasch und in charakteristischer Weise voran (Abb. 28, 29B). Der Beginn des Neuritenwachstums fällt zeitlich eng mit der morphologischen

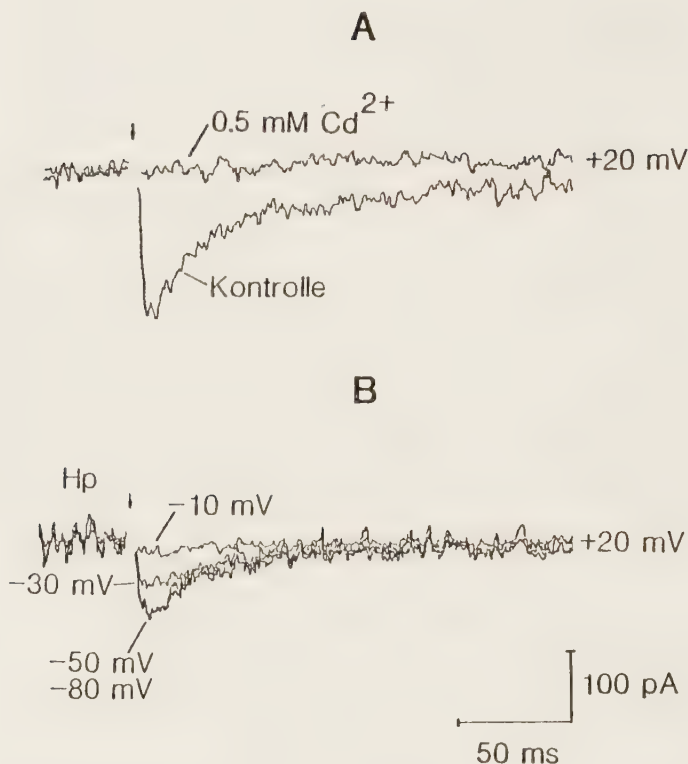


Abb. 37: Ca^{2+} -Ströme in auffällig großen Neuronen an E9.
Extrazell. Lsg.: 50Ca^{2+} .

A: Die Ca^{2+} -Ströme waren durch extrazelluläre Zugabe von 0.5 mM Cd^{2+} blockierbar. Haltepotential: -50 mV .

B: Abhängigkeit der Ca^{2+} -Ströme vom Haltepotential. Bei Haltepotentialen negativer als -50 mV waren die Ca^{2+} -Ströme gegenüber einem Haltepotential von -50 mV unverändert. Bei Haltepotentialen positiver als -30 mV war eine deutliche Reduktion der Amplitude der Ca^{2+} -Ströme beobachtbar.

Ausbildung von Ganglien zusammen. Da bereits an E7 embryonale Ganglien isoliert werden können und nach Dissoziation embryonale Zellen mit eindeutig neuronaler Morphologie vorhanden sind, besteht die Möglichkeit, die zeitliche Relation zwischen dem Auftreten von spannungsabhängigen Ionenkanälen und dem Beginn des Neuritenwachstums zu untersuchen. Obwohl an E7 noch keine auffällig großen embryonalen Neurone vorhanden sind, waren in einem Teil der Neurone bereits spannungsabhängige Ionenströme nachweisbar.

4.6.1. Na^+ -Ströme in embryonalen Neuronen an E7

Spannungsabhängige Na^+ -Ströme wurden wie an E9 isoliert. 73% der untersuchten E7-Neurone ($n=11$) zeigten keinen spannungsabhängigen Na^+ -Strom (Abb. 38A). In 27% der E7-Neurone jedoch war eindeutig ein Na^+ -Strom meßbar (Abb. 38B). Diese Na^+ -Ströme zeigten eine ähnliche Kinetik und Spannungsabhängigkeit (Abb. 38C) wie E9- Na^+ -Ströme.

4.6.2. Ca^{2+} -Ströme in embryonalen Neuronen an E7

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Ströme wurden wie an E9 in 50 mM Ca^{2+} isoliert. 80% der untersuchten E7-Neurone ($n=10$) zeigten keinen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Strom (Abb. 39A). In 20% der E7-Neurone jedoch waren Ca^{2+} -Ströme eindeutig meßbar (Abb. 39B). Diese Ca^{2+} -Ströme zeigten eine ähnliche Kinetik und Spannungsabhängigkeit (Abb. 39C) wie E9- Ca^{2+} -Ströme.

4.6.3. Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme in embryonalen Neuronen an E8

Vom 8. Embryonaltag an sind in Kulturen dissoziierter embryonaler Ganglien auffällig große Neurone vorhanden (Abb. 31). Solche auffällig großen Neurone zeigten an E8 zu 100% ($n=8$) einen Na^+ -Strom ähnlicher Kinetik und Spannungsabhängigkeit wie E9- Na^+ -Ströme (Abb. 40A). In 89% dieser Neurone ($n=9$) waren Ca^{2+} -Ströme ähnlicher Kinetik und Spannungsabhängigkeit wie an E9 nachweisbar (Abb. 40B). An E8

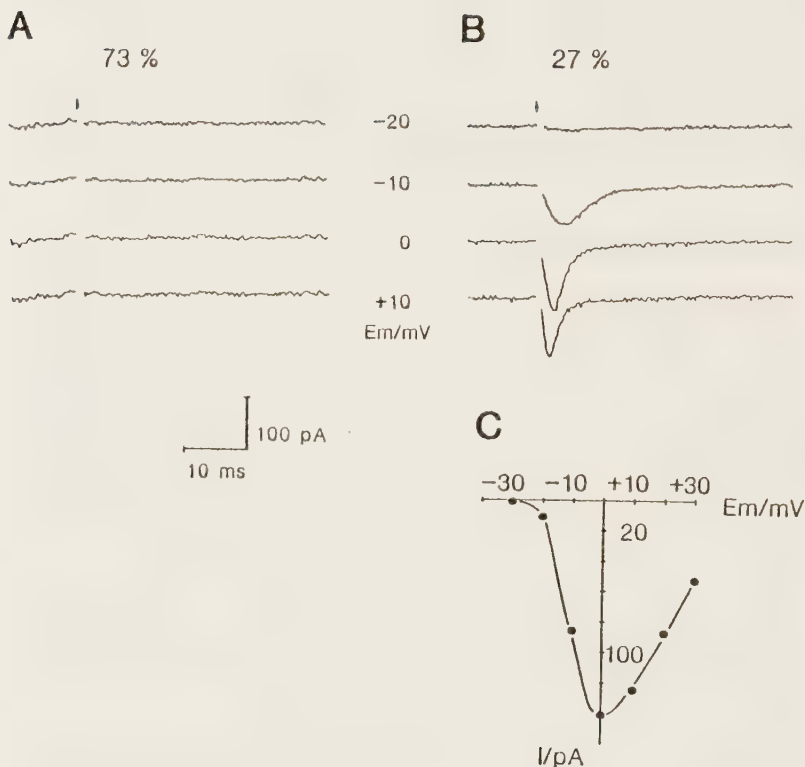


Abb. 38: Na^+ -Ströme in embryonalen Neuronen an E7.

Haltepotential: -50 mV. Extrazell. Lsg.: 120Na^+ .

A: In 73% der E7-Neurone waren keine spannungsabhängigen Na^+ -Ströme nachweisbar.

B: In 27% der E7-Neurone jedoch waren Na^+ -Ströme ähnlicher Kinetik und Spannungsabhängigkeit wie in E9-Neuronen vorhanden.

C: Strom-Spannungscharakteristik der in B gezeigten Na^+ -Ströme.

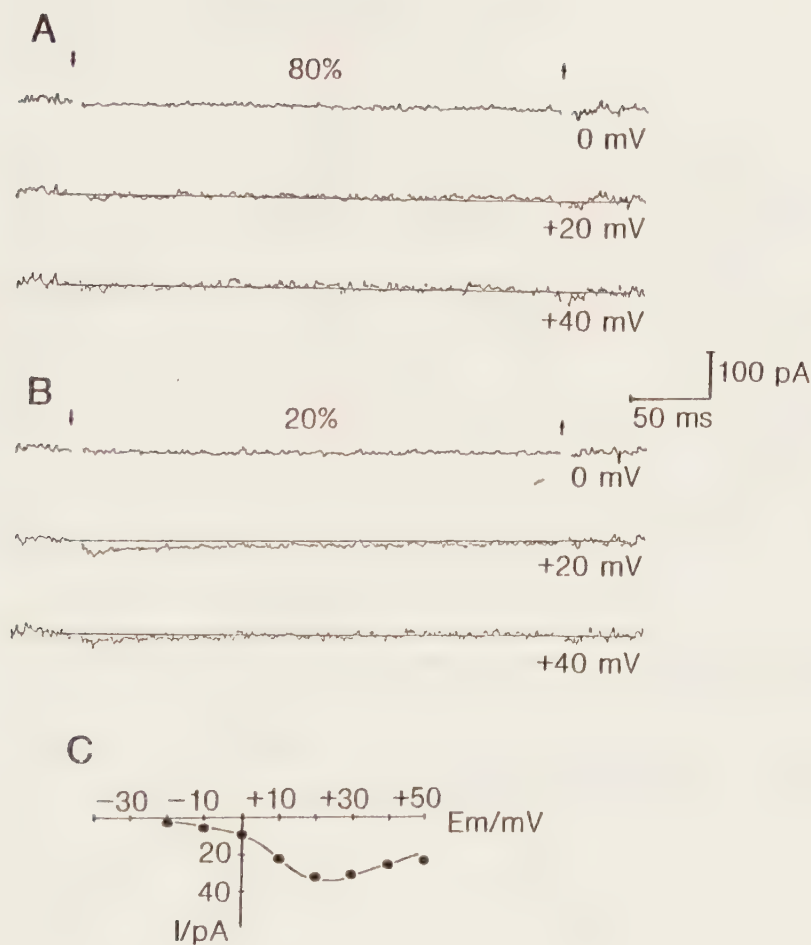


Abb. 39: Ca^{2+} -Ströme in embryonalen Neuronen an E7.

Haltepotential: -50 mV. Extrazell. Lsg.: 50Ca^{2+} .

A: In 80% der E7-Neurone waren keine spannungsabhängigen Ca^{2+} -Ströme nachweisbar.

B: In 20% der E7-Neurone jedoch waren spannungsabhängige Ca^{2+} -Ströme ähnlicher Kinetik und Spannungsabhängigkeit wie in E9-Neuronen nachweisbar.

C: Strom-Spannungscharakteristik der in B gezeigten Ca^{2+} -Ströme.

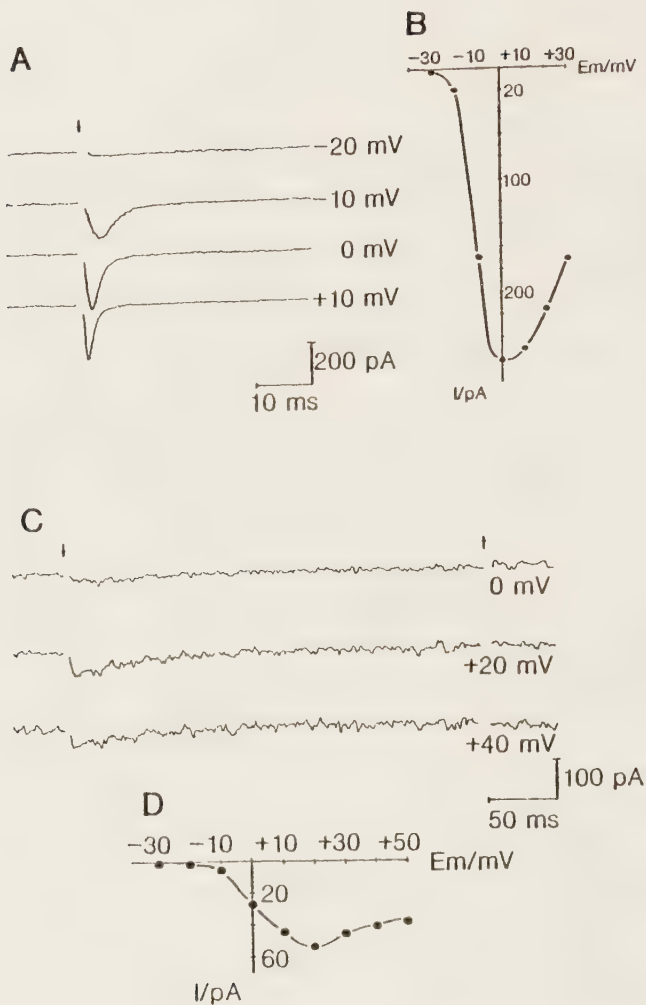


Abb. 40: Na⁺- und Ca²⁺-Ströme in auffällig großen Neuronen an E8.

Haltepotential: -50 mV.

A, B: Na⁺-Ströme in E8-Neuronen zeigten eine ähnliche Kinetik und Spannungsabhängigkeit wie in E9-Neuronen. Extrazell. Lsg.: 120Na⁺.

C, D: Ca²⁺-Ströme in E8-Neuronen zeigten ebenfalls eine ähnliche Kinetik und Spannungsabhängigkeit wie in E9-Neuronen. Extrazell. Lsg.: 50Ca²⁺.

konnte wie an E9 keine Zunahme des Ca^{2+} -Stroms bei Erniedrigung des Haltepotentials von -50 auf -80 mV beobachtet werden.

Eine Einschränkung der Zelltypvariabilität aufgrund der Größe embryonaler Neurone ist einen Tag nach Beginn des Neuritenwachstums embryonaler Retzius-Zellen möglich. Diese Neurone besaßen bereits fast alle spannungsabhängige Na^{+} - und Ca^{2+} -Ströme. Da auch an E9 nicht in allen embryonalen Neuronen spannungsabhängige somatische Na^{+} - und Ca^{2+} -Ströme vorhanden waren, kann das Fehlen von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen in einem Teil der E7-Neurone nicht nur auf eine mangelnde Differenzierung dieser Zellen zurückgeführt werden, sondern kann auch als Ausdruck einer Zelltypvariabilität betrachtet werden. Die Nachweisbarkeit spannungsabhängiger Na^{+} - und Ca^{2+} -Ströme in E7-Neuronen deutet darauf hin, daß spannungsabhängige Ionenkanäle bereits zu Beginn des Neuritenwachstums exprimiert werden.

4.7. Abhängigkeit der Eigenschaften von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen vom Entwicklungsalter

4.7.1. Abhängigkeit der Kinetik und Spannungsabhängigkeit von Na^{+} -Strömen vom Entwicklungsalter

Spannungsabhängige Na^{+} -Ströme wurden bis zum 10. Embryonaltag untersucht. Sie waren an E10 in 100% der untersuchten auffällig großen Neurone ($n=9$) vorhanden. Die an E10 meßbaren Na^{+} -Ströme zeigten eine ähnliche Kinetik und Spannungsabhängigkeit wie in früheren Entwicklungsstadien.

4.7.2. Abhängigkeit der Kinetik und Spannungsabhängigkeit von Ca^{2+} -Strömen vom Entwicklungsalter

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Ströme wurden bis zum 11. Embryonaltag untersucht. Sie waren an E10 ($n=3$) und an E11 ($n=6$) in allen untersuchten auffällig großen Neuronen

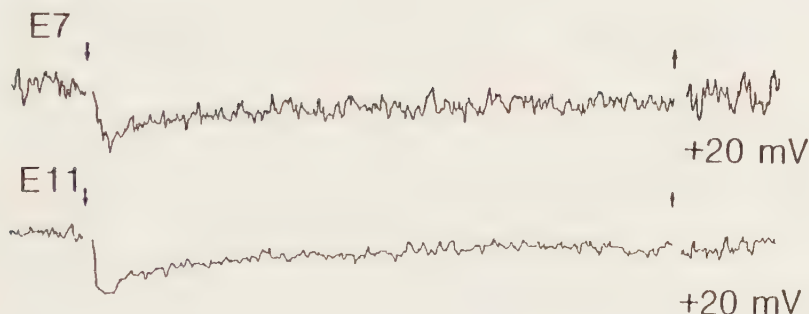
vorhanden. Die Ca^{2+} -Ströme zeigten zwischen E7 und E11 keine Veränderung ihrer Kinetik (Abb. 41A) und ihrer Spannungsabhängigkeit (Abb. 41B). Darüberhinaus konnte weder an E8 noch an E11 bei Erniedrigung des Haltepotentials von -50 auf -80 mV ein zusätzlicher Ca^{2+} -Strom beobachtet werden.

In embryonalen Blutegeleoneuronen konnte daher unabhängig vom Entwicklungsalter kein LVA-analoger Ca^{2+} -Strom nachgewiesen werden. Ein sukzessives Auftreten verschiedener Ca^{2+} -Kanaltypen wie in Hühnchenneuronen konnte aufgrund der Kinetik und Spannungsabhängigkeit der Ca^{2+} -Ströme nicht gezeigt werden. Die zum frühestmöglichen Zeitpunkt meßbaren Ca^{2+} -Ströme besaßen eine ähnliche Kinetik und Spannungsabhängigkeit wie Ca^{2+} -Ströme in älteren embryonalen Neuronen.

4.7.3. Abhängigkeit der Amplitude von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen vom Entwicklungsalter

Die maximale Amplitude der Na^{+} - und Ca^{2+} -Ströme wurde in den verschiedenen Entwicklungsstadien bei einem Membranpotential von -10 bis 0 mV bzw. +20 bis +30 mV für jede Zelle bestimmt und für jedes Stadium der Mittelwert gebildet. Die Na^{+} - und Ca^{2+} -Ströme zeigten zwischen E7 und E10 bzw. E11 eine 6-7fache Zunahme der Amplitude (Abb. 42); von 94.4 ± 53.4 pA an E7 auf 547.1 ± 308.1 pA an E10 für Na^{+} -Ströme und von 22.7 ± 13.3 pA an E7 auf 159.0 ± 63.2 pA an E11 für Ca^{2+} -Ströme. Da gleichzeitig zwischen E7 und E10 eine nur 3fache Zunahme der Somaoberfläche von $622 \pm 126 \mu\text{m}^2$ auf $1784 \pm 557 \mu\text{m}^2$ erfolgte, kann auf eine Zunahme der Stromdichten sowohl der Na^{+} - als auch der Ca^{2+} -Ströme geschlossen werden.

A



B

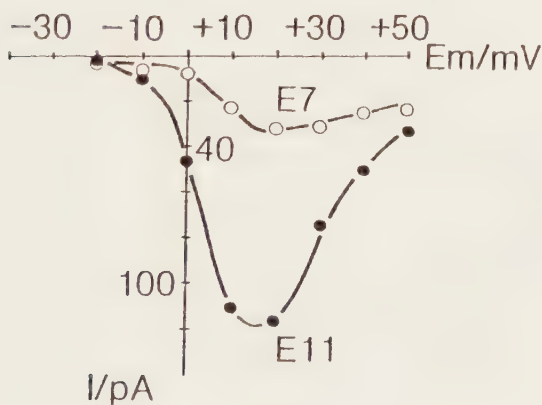


Abb. 41: Abhängigkeit der Eigenschaften von Ca^{2+} -Strömen vom Entwicklungsalter.

Haltepotential: -50 mV. Extrazell. Lsg.: 50Ca^{2+} .

A: Ca^{2+} -Ströme an E7 und an E11 zeigten eine ähnliche Kinetik. Beide Ca^{2+} -Ströme sind in gleicher Größe dargestellt. Maximale Amplitude des E7-Stroms: 32 pA. Maximale Amplitude des E11-Stroms: 117 pA.

B: Ca^{2+} -Ströme an E7 und an E11 besaßen eine ähnliche Strom-Spannungscharakteristik.

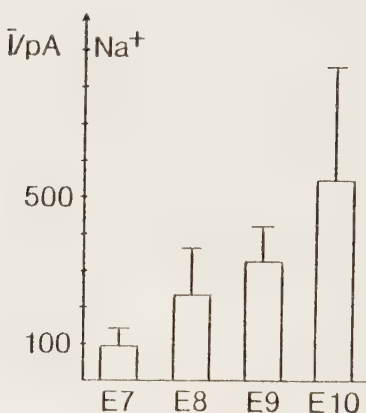
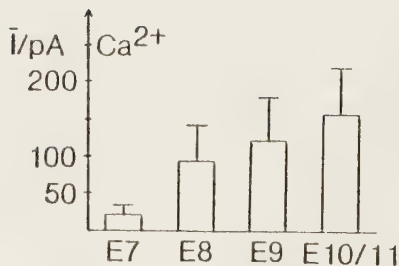
A**B**

Abb. 42: Abhängigkeit der Amplitude von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen vom Entwicklungsalter.

A: Zunahme der mittleren maximalen Amplitude der Na^+ -Ströme mit dem Entwicklungsalter (Membranpotential: -10 bis 0 mV; Extrazell. Lsg.: 120Na^+).

B: Zunahme der mittleren maximalen Amplitude der Ca^{2+} -Ströme mit dem Entwicklungsalter (Membranpotential: +20 bis +30 mV; Extrazell. Lsg.: 50Ca^{2+}).

Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

E. Diskussion

1. Zeitpunkt der Expression von Na^+ und Ca^{2+} -Strömen im Verlauf der neuronalen Differenzierung

Der Zeitpunkt des ersten Auftretens spannungsabhängiger Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme im Verlauf der neuronalen Differenzierung konnte in Beziehung gesetzt werden zum Zeitpunkt der terminalen Mitose und zum Beginn des Neuritenwachstums. Dies erlaubt es, einzuschätzen, ob spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme bereits in einer frühen Phase der neuronalen Differenzierung vorhanden sind und daher eine Rolle in neuronalen Differenzierungsprozessen spielen könnten.

1.1. Zeitliche Relation zur terminalen Mitose

Bei den untersuchten neuronalen DRG-Vorläuferzellen handelt es sich um postmitotische Zellen, die ihre terminale DNS-Synthesephase vor höchstens 18 Stunden beendet haben (Rohrer und Thoenen, 1987). Sie besitzen zunächst noch nicht das neuronenspezifische Q211-Antigen und exprimieren dieses im Verlauf der nächsten 24 Stunden in Kultur (Rohrer et al., 1985). Trotzdem konnte in mindestens 50% der Zellen bereits nach 1-5 Stunden in Kultur ein spannungsabhängiger LVA- Ca^{2+} -Strom nachgewiesen werden (Abb. 8, 10). Die Expression des LVA- Ca^{2+} -Stroms scheint zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen zu sein, da zwischen 5-10 Stunden in Kultur der Prozentsatz der Zellen, in denen ein LVA- Ca^{2+} -Strom nachweisbar ist, noch deutlich zunimmt (Abb. 10) und in den ersten 30 Stunden auch eine deutliche Zunahme der Stromdichte des LVA- Ca^{2+} -Stroms beobachtbar ist (Abb. 11). Nimmt man für das Auftreten des LVA- Ca^{2+} -Stroms einen ähnlichen Zeitverlauf an, wie er für den Na^+ - und HVA- Ca^{2+} -Strom beobachtet wurde, so läßt sich abschätzen, daß die Expression des LVA- Ca^{2+} -Stroms 8-13 Stunden nach Beendigung der terminalen DNS-Synthesephase beginnt. Spannungsabhängige Na^+ - und HVA- Ca^{2+} -

Ströme traten nach 15 Stunden in Kultur, also höchstens 33 Stunden nach Beendigung der terminalen DNS-Synthesephase auf (Abb. 10). In kultivierten DRG-Vorläuferzellen wurden daher spannungsabhängige Na^{+} - und Ca^{2+} -Ströme bereits kurze Zeit nach der terminalen Mitose exprimiert. Dies stimmt überein mit Untersuchungen an embryonalen Rohon-Beard-Neuronen, die 6 Stunden nach der terminalen DNS-Synthesephase noch nicht elektrisch erregbar sind, jedoch einige Stunden später Aktionspotentiale erzeugen können (Spitzer, 1983).

Die untersuchte Population von DRG-Vorläuferzellen weist in Bezug auf die terminale Mitose eine Streuung von 12 Stunden auf (Rohrer und Thoenen, 1987). Das Zeitintervall zwischen dem ersten Auftreten von Na^{+} - und HVA- Ca^{2+} -Strömen und dem Zeitpunkt, an dem fast alle Zellen diese Ströme zeigten, betrug 10-15 Stunden (Abb. 16). Die zeitliche Streuung der Population bezüglich des Auftretens von Na^{+} - und HVA- Ca^{2+} -Strömen entsprach damit der Streuung bezüglich des Zeitpunktes der terminalen Mitose. Dies läßt darauf schließen, daß zumindest die Expression des Na^{+} - und des HVA- Ca^{2+} -Stroms in einem streng definierten zeitlichen Abstand nach der terminalen Mitose erfolgt. Jedoch scheint dies nur für Neuronentypen zu gelten, die neuronale Eigenschaften erst nach der terminalen Mitose exprimieren. Im Gegensatz zu DRG-Vorläuferzellen konnten in proliferierenden sympathischen Neuronen, die bereits das neuronenspezifische Q211-Antigen exprimieren (Rohrer und Thoenen, 1987), sowohl spannungsabhängige Na^{+} - als auch Ca^{2+} -Ströme beobachtet werden (Abb. 17).

1.2. Zeitliche Relation zum Beginn des Neuritenwachstums

Im Blutegelembryo konnten embryonale Retzius-Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Dopaminaufnahme einschließlich ihrer Neurite dargestellt werden. Das Neuritenwachstum embryonaler Retzius-Zellen begann am 7. Embryonaltag (Abb. 28, 29), kurz nachdem embryonale Ganglien morphologisch erkennbar waren (Abb. 27). Wurden embryonale Ganglien an E7

dissoziiert, so konnten keine auffälligen Größenunterschiede zwischen den embryonalen Neuronen beobachtet werden (Abb. 31). Eine Beschränkung der Zelltypvariabilität war daher in diesem Stadium noch nicht möglich. In 20-30% der an E7 untersuchten embryonalen Neurone konnten bereits sowohl somatische Na^+ - als auch Ca^{2+} -Ströme nachgewiesen werden (Abb. 38, 39). Das Fehlen von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in den übrigen E7-Zellen kann auf zwei Arten erklärt werden:

i.) Die Zellen sind noch undifferenziert und zeigen daher keine somatischen Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme.

ii.) Adulte Motoneurone sind nicht in der Lage, somatische Aktionspotentiale zu erzeugen (Muller et al., 1981), was auf das Fehlen zumindest spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle in der somatischen Membran von Motoneuronen schließen läßt. Da auch am 9. Embryonaltag somatische Na^+ -Ströme nicht und somatische Ca^{2+} -Ströme nur in einem Teil der kleinen Neurone nachgewiesen werden konnten, kann das Fehlen von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen an E9 und an E7 auch dadurch erklärt werden, daß es sich bei den untersuchten Zellen um Vorläufer von Motoneuronen handelt, die auch im adulten Zustand somatische Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme nicht oder nur in geringem Maße exprimieren.

Wurden embryonale Ganglien an E8 dissoziiert, so war eine Population auffällig großer embryonaler Neurone vorhanden (Abb. 31). Da die Größenzunahme embryonaler Retzius-Zellen zwischen E7 und E8 beginnt (Abb. 28) und Retzius-Zellen auch in embryonalen Ganglien größer als andere Zelltypen sind (Abb. 28), erscheint es wahrscheinlich, daß es sich bei der Population auffällig großer Neurone zumindest teilweise um embryonale Retzius-Zellen handelt. An E8 konnten in fast allen auffällig großen Zellen sowohl spannungsabhängige Na^+ - als auch Ca^{2+} -Ströme (Abb. 40) nachgewiesen werden.

Dies zeigt, daß Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme spätestens einen Tag nach Beginn des Neuritenwachstums exprimiert sind. Das Vorhandensein von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in E7-Zellen spricht dafür, daß Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme bereits zu Beginn des

Neuritenwachstums vorhanden sind. Da beim Blutegel synaptische Kontakte im Neuropil, das beim adulten Tier aus den stark verästelten Neuriten im Zentrum des Ganglions besteht, gebildet werden (Coggeshall und Fawcett, 1964; DeRiemer und Macagno, 1981) und an E7 das Neuropil eindeutig noch nicht ausgebildet ist (Abb. 28), erscheint es wahrscheinlich, daß die Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen deutlich früher als die Ausbildung synaptischer Strukturen erfolgt. Im Gegensatz zu dem hier beobachteten frühen Auftreten von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen konnte an differenzierenden Heuschreckenneuronen gezeigt werden, daß somatische Aktionspotentiale erst 4 Tage nach dem Beginn des Neuritenwachstums nachweisbar sind (Goodman und Spitzer, 1979). Dies könnte jedoch auch dadurch erklärt werden, daß spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme unter voltage-clamp Bedingungen bereits bei geringer Stromdichte nachweisbar sind; die Fähigkeit zur Erzeugung von Aktionspotentialen dagegen wesentlich höhere Stromdichten erfordert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme spätestens kurz nach der terminalen Mitose und bereits zu Beginn des Neuritenwachstums nachweisbar waren. Spannungsabhängige Ionenkanäle könnten daher an neuronalen Differenzierungsprozessen beteiligt sein. Eine solche Funktion erscheint vor allem für spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in Wachstumskegeln für die Steuerung des Neuritenwachstums und für das Auffinden der richtigen Zielzellen möglich. So konnte bei kultivierten PC-12 Zellen durch selektive Perfusion verschiedener Membranbereiche gezeigt werden, daß spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle spezifisch in den Wachstumskegeln auswachsender Neurite lokalisiert sind (Streit und Lux, 1987; 1988). Weiterhin ist gezeigt worden, daß das Neuritenwachstum mit dem Einstrom von Ca^{2+} durch die Zellmembran korreliert ist (Mattson und Kater, 1987).

2. Zeitliche Sequenz der Expression von Ionenströmen

Spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme könnten gleichzeitig exprimiert werden; es wäre jedoch auch denkbar, daß embryonale Neurone für längere Zeit zunächst nur einen der beiden Typen von Einwärtsströmen besitzen. Sowohl in embryonalen Blutegelneuronen als auch in Ciliarvorläuferzellen waren jedoch zum frühest möglichen Zeitpunkt, an dem die Zellen auf das Vorhandensein von Ionenströmen hin untersucht werden konnten, bereits sowohl Na^+ - als auch Ca^{2+} -Ströme zumindest in einem Teil der Zellen vorhanden. Das längste beobachtete Zeitintervall in dem embryonale Zellen einen Ca^{2+} -Strom exprimierten ohne gleichzeitig einen spannungsabhängigen Na^+ -Strom zu besitzen, betrug im Falle der DRG-Vorläuferzellen 15 Stunden (Abb. 10). Dies spricht dafür, daß Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme zwar nicht exakt gleichzeitig, jedoch innerhalb eines Zeitraumes von weniger als einem Tag exprimiert werden. Damit übereinstimmend ist auch für kultivierte Neuralleistenzellen gezeigt worden, daß Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme gleichzeitig auftreten (Bader et al., 1983). K^+ -Auswärtsströme sind bereits vor den Einwärtsströmen vorhanden, wie für DRG-Vorläuferzellen (Rohrer et al., 1985) und für kultivierte Neuralleistenzellen (Bader et al., 1983) gezeigt worden ist. Das Vorhandensein von K^+ -Auswärtsströmen in den ersten Stunden in Kultur in allen untersuchten Ciliarvorläuferzellen (Abb. 18) stimmt damit überein.

2.1. Zeitliche Sequenz der Expression verschiedener Typen von Ca^{2+} -Strömen

Für differenzierende DRG-Vorläuferzellen ist beschrieben worden, daß sie die beiden in DRG-Neuronen vorhandenen Typen von Ca^{2+} -Kanälen (Carbone und Lux, 1984b) nacheinander exprimieren. Nach 3 Stunden in Kultur ist lediglich der LVA- Ca^{2+} -Strom nachweisbar, während nach 24 Stunden beide Ca^{2+} -Kanäle vorhanden sind (Rohrer et al., 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde der exakte Zeitverlauf der

Expression von LVA-Ca²⁺- und HVA-Ca²⁺-Strömen in DRG-Vorläuferzellen bestimmt. In Übereinstimmung mit Rohrer et al., 1985 trat der HVA-Ca²⁺-Strom erst 15-20 Stunden nach dem LVA-Ca²⁺-Strom auf (Abb. 22). Weiterhin konnte die gleiche Sequenz der Expression dieser 2 Typen von Ca²⁺-Strömen für differenzierende Ciliarvorläuferzellen gezeigt werden, jedoch trat der HVA-Ca²⁺-Strom bereits nach 5 Stunden in Kultur auf (Abb. 22). Die Expression des HVA-Ca²⁺-Stroms stellt dabei einen Differenzierungsprozess da und ist nicht durch das regenerative Auswachsen von Neuriten nach der Dissoziationsprozedur bedingt. Frisch dissoziierte, differenzierte Ciliarneurone, die nur vergleichbar kurze Neurite, wie Ciliarvorläuferzellen in den ersten Stunden in Kultur besaßen (Abb. 3C, 4A), zeigten deutliche HVA-Ca²⁺-Ströme (Abb. 24). Auch in kultivierten, embryonalen Hippocampusneuronen (Yaari et al., 1987) trat der LVA-Ca²⁺-vor dem HVA-Ca²⁺-Strom auf. Darüberhinaus konnte an in Kultur differenzierenden Teratokarzinomzellen der Maus als erster Hinweis auf einen Einwärtsstrom eine dem LVA-Ca²⁺-Strom ähnliche Ca²⁺-Leitfähigkeit beobachtet werden (Simmonneau et al., 1985).

Alle bisher untersuchten Vertebratenneurone exprimieren daher als ersten Ca²⁺-Strom einen LVA-Ca²⁺-Strom, während der HVA-Ca²⁺-Strom erst später auftritt. In embryonalen Blutegeleuronen dagegen konnte unabhängig vom Entwicklungsalter bisher nur ein Typ von Ca²⁺-Strömen nachgewiesen werden (Abb. 37B, 41). In diesen Zellen scheinen daher nur spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle eines Typs vorhanden zu sein. Dies deutet darauf hin, daß die zwei verschiedenen Typen von Ca²⁺-Kanälen in Vertebratenneuronen erst im Verlauf der phylogenetischen Höherentwicklung möglicherweise durch Genduplikation aus ursprünglich einem Ca²⁺-Kanal hervorgegangen sind.

3. Eigenschaften früher Na⁺- und Ca²⁺-Ströme

Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme könnten zu Beginn ihrer Expression in ihren Eigenschaften von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in differenzierten Neuronen abweichen oder bereits zu Beginn ihrer Expression die gleichen Eigenschaften aufweisen.

In DRG-Vorläuferzellen zeigten Na^+ -Ströme unmittelbar nach ihrem ersten Auftreten eine ähnliche Kinetik und Spannungsabhängigkeit (Abb. 7) wie in differenzierten DRG-Neuronen (Carbone und Lux, 1986b) und waren bereits zu diesem frühen Zeitpunkt durch TTX vollständig blockierbar (Abb. 12). Gleiches konnte auch für differenzierende Ciliarvorläuferzellen gezeigt werden (Abb. 19, 25). Im Gegensatz dazu waren die Na^+ -Ströme in embryonalen Blutegelneuronen, wie auch für adulte Blutegelneurone beschrieben (Kleinhaus und Prichard, 1976; Johansen und Kleinhaus, 1986), insensitiv gegenüber TTX (Abb. 34B).

Dies zeigt, daß spannungsabhängige Na^+ -Ströme bereits zu Beginn ihrer Expression die gleichen Eigenschaften aufweisen wie in differenzierten Neuronen. Auch speziesspezifische Unterschiede lassen sich bereits in frühen embryonalen Zellen nachweisen.

Die beiden Typen von Ca^{2+} -Strömen zeigten sowohl in DRG- als auch in Ciliarvorläuferzellen eine ähnliche Kinetik und Spannungsabhängigkeit (Abb. 7, 8, 20, 21) wie in differenzierten DRG-Neuronen (Carbone und Lux, 1987a) und sie waren durch 0.5 mM Cd^{2+} blockierbar (Abb. 6B, 13A, 26A,C). Ca^{2+} -Kanäle in differenzierten DRG-Neuronen scheinen im Gegensatz zu Ca^{2+} -Kanälen in Herzmuskelzellen durch eine schnelle extrazelluläre pH-Änderung so transformiert werden zu können, daß sie Na^+ leitend werden (Kannerth et al, 1987; Davies et al., 1988). DRG-Vorläuferzellen zeigten bereits in den ersten Stunden in Kultur einen pH-induzierten Na^+ -Strom mit ähnlichem Zeitverlauf wie in differenzierten DRG-Neuronen (Abb. 14). Dies deutet darauf hin, daß auch frühe neuronale Ca^{2+} -Kanäle die gleichen Eigenschaften aufweisen wie in differenzierten Neuronen. Auch in embryonalen Blutegelneuronen entsprachen die Ca^{2+} -Ströme an E7 in ihrer Kinetik und Spannungsabhängigkeit den Ca^{2+} -Strömen an E11

(Abb. 41). Es war allerdings nur ein Typ von Ca^{2+} -Strömen vorhanden (Abb. 37B), sodaß wiederum speziesspezifische Unterschiede bereits bei embryonalen Zellen nachweisbar waren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß weder für Na^{+} - noch für Ca^{2+} -Ströme abweichende Eigenschaften zu Beginn ihrer Expression beobachtet werden konnten. Dies deutet darauf hin, daß Na^{+} - und Ca^{2+} -Kanäle bereits zu Beginn der Expression von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen die gleiche molekulare Struktur besitzen wie in differenzierten Neuronen. Speziesspezifische Unterschiede in den spannungsabhängigen Ionenkanälen jedoch waren bereits bei embryonalen Zellen nachweisbar.

Bei einem Teil der DRG-Vorläuferzellen in den ersten 5 Stunden in Kultur konnte kein spannungsabhängiger Ca^{2+} -Strom nachgewiesen werden. Trotzdem war in diesen Zellen ein pH-induzierter Strom vorhanden (Abb. 15). Dies könnte darauf hindeuten, daß Ca^{2+} -Kanäle zunächst in einer inaktiven Form, in der sie sich noch nicht membranpotentialabhängig öffnen können, exprimiert werden.

4. Abhängigkeit der Expression von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen vom Zelltyp

Verschiedene Typen von Neuronen können auch aufgrund ihrer spannungsabhängigen Ionenkanäle unterschieden werden. So ist zum Beispiel der in DRG-Neuronen beschriebene LVA- Ca^{2+} -Strom in differenzierten sympathischen Neuronen nicht nachweisbar (Marchetti et al., 1986). Diese Unterschiede könnten im Verlauf der neuronalen Differenzierung entweder erst ausgebildet werden, nachdem die embryonalen Neurone erste spannungsabhängige Ionenströme exprimiert haben. Die verschiedenen Typen von Neuronen würden dann zunächst alle ein gemeinsames Stadium eines unreifen Neurons durchlaufen, in dem sie spannungsabhängige Ionenströme in gleicher Weise exprimieren. Es wäre jedoch auch denkbar, daß sich die verschiedenen Neuronentypen bereits in der Ausbildung der ersten Ionenströme unterscheiden, sodaß die Vorläufer der

verschiedenen Neuronentypen jeweils spezifische Differenzierungswege aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in DRG-Vorläuferzellen mit der Expression von Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in neuronalen Vorläuferzellen aus dem Ciliarganglion verglichen. Ciliarvorläuferzellen können auf ähnliche Weise isoliert werden und differenzieren unter vergleichbaren Kulturbedingungen wie DRG-Vorläuferzellen zu Neuronen aus (Rohrer und Thoenen, 1987).

Vergleicht man die zeitliche Sequenz der Expression von Ca^{2+} -Strömen, so zeigt sich, daß bei Ciliarvorläuferzellen der HVA- Ca^{2+} -Strom früher auftrat als bei DRG-Vorläuferzellen (Abb. 22). Ein weitaus deutlicherer Unterschied war jedoch bezüglich der Expression des Na^+ -Stroms vorhanden. Während bei Ciliarvorläuferzellen der Na^+ -Strom bereits in den ersten Stunden in Kultur von fast allen Zellen exprimiert wurde, traten bei DRG-Vorläuferzellen die ersten Na^+ -Ströme erst nach 15 Stunden in Kultur auf (Abb. 22). Der Na^+ -Strom trat darüberhinaus bei Ciliarvorläuferzellen deutlich vor dem HVA- Ca^{2+} -Strom, bei DRG-Vorläuferzellen dagegen gleichzeitig mit dem HVA- Ca^{2+} -Strom auf. Es erscheint aus 2 Gründen unwahrscheinlich, daß diese Unterschiede in der Sequenz der Expression von Ionenströmen durch die Kulturbedingungen bedingt sind:

i.) Es konnte gezeigt werden, daß die Expression der Na^+ - und Ca^{2+} -Ströme in DRG-Vorläuferzellen unabhängig vom Vorhandensein ausdifferenzierter Gliazellen ist, die für das Überleben von Ciliarvorläuferzellen notwendig sind.

ii.) Die Ciliarvorläuferzellen besaßen bereits zu Beginn der Kultivierung zu einem Großteil sowohl LVA- Ca^{2+} - als auch Na^+ -Ströme, die DRG-Vorläuferzellen dagegen zunächst nur LVA- Ca^{2+} -Ströme. Zelltypspezifische Unterschiede waren daher bereits zu Beginn der Kultivierung vorhanden.

Die bei Ciliarvorläuferzellen nach 1-5 und 25-30 Stunden in Kultur jeweils größere mittlere Amplitude des Na^+ -Stroms kann ebenfalls durch den früheren Beginn der Expression des Na^+ -Stroms erklärt werden. Darüberhinaus konnte ein

Unterschied in den relativen Proportionen der beiden Typen von Ca^{2+} -Strömen beobachtet werden. Während beide Zelltypen nach 1-5 Stunden in Kultur lediglich einen LVA- Ca^{2+} -Strom etwa gleicher Amplitude exprimierten, war nach 25-30 Stunden das Verhältnis von LVA- Ca^{2+} - zu HVA- Ca^{2+} -Strom in Ciliarvorläuferzellen deutlich geringer als in DRG-Vorläuferzellen, obwohl die HVA- Ca^{2+} -Ströme etwa gleiche Amplitude zeigten (Abb. 23). Die relativ schwächere Expression des LVA- Ca^{2+} -Stroms in Ciliarvorläuferzellen scheint ebenfalls nicht durch die Kultivierungsprozedur bedingt zu sein, da auch bei in vivo differenzierten Ciliarneuronen der LVA- Ca^{2+} -Strom zumindest deutlich geringer ausgebildet ist, als bei DRG-Neuronen (Abb. 1, 24).

Dies zeigt, daß bereits zu Beginn der Expression von Na^{+} - und Ca^{2+} -Strömen zelltypspezifische Unterschiede sowohl bezüglich der Na^{+} - als auch der Ca^{2+} -Ströme vorhanden waren. Es scheint daher kein den verschiedenen Neuronentypen gemeinsames Stadium eines unreifen Neurons, in dem spannungsabhängige Ionenströme in gleicher Weise exprimiert werden, zu geben, lediglich bezüglich der Ca^{2+} -Ströme erscheint es möglich, daß differenzierende Vertebratenneurone zunächst immer ein Stadium durchlaufen, in dem nur der LVA- Ca^{2+} -Strom exprimiert wird.

Auch in embryonalen Blutegelneuronen konnte ein Hinweis auf das frühe Vorhandensein zelltypspezifischer Unterschiede beobachtet werden. So waren am 9. Embryonaltag in kleinen Zellen, die möglicherweise die Vorläufer von Motoneuronen darstellen, keine somatischen Na^{+} -Ströme nachweisbar, während in allen auffällig großen Neuronen Na^{+} -Ströme deutlich vorhanden waren (Abb. 33, 35).

Literaturverzeichnis

P.I. Baccaglini and N.C. Spitzer, 1977. Developmental changes in the inward current of the action potential of Rohon-Beard neurones. *J. Physiol.* 271; 93-117.

C.R. Bader, D. Bertrand, E. Dupin and A.C. Kato, 1983. Development of electrical membrane properties in cultured avian neural crest. *Nature* 305; 808-810.

M.E. Barish, 1986. Differentiation of voltage-gated potassium current and modulation of excitability in cultured amphibian spinal neurones. *J. Physiol.* 375; 229-250.

A.M. Brown, H. Camerer, D.L. Kunze and H.D. Lux, 1982. Similarity of unitary Ca^{2+} currents in three different species. *Nature* 299, 156-158.

W. Boll and H.D. Lux, 1985. Action of organic antagonists on neuronal calcium currents. *Neurosci. Lett.* 56; 335-339.

J.L. Bossu, A. Feltz and J.M. Thomann, 1985. Depolarization elicits two distinct calcium currents in vertebrate sensory neurons. *Pflügers Arch.* 403; 360-368.

L. Byerly and B. Yazejian, 1986. Intracellular factors for the maintainance of calcium currents in perfused neurones from the snail, *Lymnea stagnalis*. *J. Physiol.* 370; 631-650.

E. Carbone and H.D. Lux, 1984a. A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys. J.* 46; 413-418.

E. Carbone and H.D. Lux, 1984b. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310; 501-502.

E. Carbone and H.D. Lux, 1986a. Low and high voltage-activated calcium channels in vertebrate cultured neurons: Properties and functions. In "Calcium electrogenesis and neuronal functioning", U. Heinemann, M. Klee, N. Neher and W. Singer eds., Exp. Brain Res. Series 14, Springer-Verlag.

E. Carbone and H.D. Lux, 1986b. Na^+ channels in cultured chick dorsal root ganglion neurons. *Europ. Biophys. J.* 13; 259-271.

E. Carbone and H.D. Lux, 1987a. Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J. Physiol.* 386; 547-570.

E. Carbone and H.D. Lux, 1987b. Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurones. *J. Physiol.* 386; 571-601.

J.E. Chad and R. Eckert, 1986. An enzymatic mechanism for calcium current inactivation in dialysed *Helix* neurones. *J. Physiol.* 378; 31-51.

M. Chiquet and S.E. Acklin, 1986. Attachment to ConA or extracellular matrix initiates rapid sprouting by cultured leech neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83; 6188-6192.

A. Cohen and M. Schlesinger, 1970. Absorption of Guinea pig serum with agar. A method for elimination of its cytotoxicity for murine thymus cells. *Transplantation* 10; 130-132.

R.E. Coggeshall and D.W. Fawcett, 1964. The fine structure of the central nervous system of the leech, *Hirudo medicinalis*. *J. Neurophysiol.* 27; 229-289.

N.W. Davies, H.D. Lux and M. Morad, 1988. Site and mechanism of activation of proton-induced sodium current in chick dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* 400; 159-187.

S.A. DeRiemer and E.R. Macagno, 1981. Light microscopic analysis of contacts between pairs of identified leech neurons with combined use of horseradish peroxidase and lucifer yellow. *J. of Neurosci.* 1; 650-657.

I.D. Dietzel, P. Drapeau and J.G. Nicholls, 1986. Voltage dependence of 5-hydroxytryptamine release at a synapse between identified leech neurones in culture. *J. Physiol.* 372; 191-205.

I.D. Dietzel and K. Gottmann, 1988. Development of dopamine containing neurons and dopamine uptake in embryos of *Hirudo medicinalis*. *Dev. Biol.*; im Druck.

D. Edgar, Y.A. Barde and H. Thoenen, 1981. Subpopulations of cultured sympathetic neurons differ in their requirements for survival factors. *Nature* 289; 294-295.

U. Ernsberger and H. Rohrer, 1988. Neuronal precursor cells in chick dorsal root ganglia: differentiation and survival in vitro. *Dev. Biol.* 126, 420-432.

S.A. Fedulova, P.G. Kostyuk and N.S. Veselovsky, 1985. Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* 359; 431-446.

J. Fernandez and G.S. Stent, 1982. Embryonic development of the hirudinid leech *Hirudo medicinalis*: structur, development and segmentation of the germinal plate. *J. Embryol. exp. Morph.* 72, 671-96.

J.C. Glover and A. Mason, 1986. Morphogenesis of an identified leech neuron: segmental specification of axonal outgrowth. *Dev. Biol.* 115, 256-260.

C.S. Goodman and N.C. Spitzer, 1979. Embryonic development of identified neurones: differentiation from neuroblast to neurone. *Nature* 280; 208-214.

C.S. Goodman and N.C. Spitzer, 1981. The development of electrical properties of identified neurones in grasshopper embryos. *J. Physiol.* 313; 385-403.

C.S. Goodman and M.J. Bastiani, 1985. Wie embryonale Nervenzellen einander erkennen. *Spektrum der Wissenschaft*, Februar 1985, 48-58.

S. Hagiwara, 1981. Calcium channel. *Ann. Rev. Neurosci.* 4; 69-125.

O.P. Hamill, A. Marthy, E. Neher, B. Sakmann and F.J. Sigworth, 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391; 85-100.

L.P. Henderson, 1983. The role of 5-Hydroxytryptamine as a transmitter between identified leech neurones in culture. *J. Physiol.* 339, 309-324.

B. Hille, 1984. *Ionic channels of excitable membranes.* Sinauer, Sunderland, MA.

A.L. Hodgkin and A.F. Huxley, 1952a. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116; 449-472.

A.L. Hodgkin and A.F. Huxley, 1952b. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117; 500-544.

J. Johansen and A.L. Kleinhaus, 1986. Differential sensitivity of tetrodotoxin of nociceptive neurons in 4 species of leeches. *J. of Neurosci.* 6; 3499-3504.

B. Katz, 1979. *Nerv, Muskel und Synapse*. Thieme, Stuttgart.

A.L. Kleinhaus and J.W. Prichard, 1976. Sodium dependent tetrodotoxin-resistant action potentials in a leech neuron. *Brain Res.* 102; 368-373.

A. Konnerth, H.D. Lux and M. Morad, 1987. Proton-induced transformation of calcium channel in chick dorsal root ganglion cells. *J. Physiol.* 386; 603-633.

P.G. Kostyuk, N.S. Veselovsky and S.A. Fedulova, 1981. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons - II. Calcium currents. *Neuroscience* 6; 2431-2437.

N.M. LeDouarin, 1982. *The neural crest*. Cambridge University Press, Cambridge.

N.M. LeDouarin, 1986. Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. *Science* 231; 1515-1522.

C.M. Lent, R.L. Mueller and D.A. Haycock, 1983. Chromatographic and histochemical identification of dopamine within an identified neuron in the leech nervous system. *J. of Neurochemistry*, 41; 481-490.

R.O. Lockerbie, 1987. The neuronal growth cone: a review of its locomotory, navigational and target recognition capabilities. *Neuroscience* 20; 719-729.

M. Manthorpe, S.D. Skaper, L.R. Williams and S. Varon, 1986. Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neuronotrophic factor. *Brain Res.* 367; 282-286.

C. Marchetti, E. Carbone and H.D. Lux, 1986. Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflügers Arch.* 406; 104-111.

M.P. Mattson and S.B. Kater, 1987. Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *J. of Neurosci.* 7; 4034-4043.

M. Mishina, T. Takai, K. Imoto, M. Noda, T. Takahashi, C. Methfessel and B. Sakmann, 1986. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321, 406-411.

K.J. Muller, J.G. Nicholls and G.S. Stent eds., 1981. *Neurobiology of the leech.* Cold Spring Harbour Laboratory.

A. Marty and E. Neher, 1983. Tight-seal whole-cell recording. In B. Sakmann and E. Neher eds., "Single-channel recording", Plenum Press, New York.

J.G. Nicholls and D.A. Baylor, 1968. Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *J. of Neurophysiology* 31; 740-756.

M. Noda, Y. Furutani, H. Takahashi, M. Toyosato, T. Tanabe, S. Shimizu, S. Kikuyotani, T. Kayano, T. Hirose, S. Inayama and S. Numa, 1983. Cloning and sequence of calf cDNA and human genomic DNA encoding α -subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 305, 818-823.

D.K. O'Dowd, A.B. Ribera and N.C. Spitzer, 1988. Development of voltage dependent calcium, sodium and potassium currents in *Xenopus* spinal neurons. *J. of Neuroscience*; im Druck.

D.F. Ready and J. Nicholls, 1979. Identified neurones isolated from leech CNS make selective connections in culture. *Nature* 281; 67-69.

H. Rösner, M. Al-Aqtum and S. Henke-Fahle, 1985. Developmental expression of GD3 and polysialogangliosides in embryonic chicken nervous tissue reacting with monoclonal antiganglioside antibodies. *Dev. Brain Res.* 18; 85-95.

H. Rohrer, S. Henke-Fahle, T. El-Sharkawy, H.D. Lux and H. Thoenen, 1985. Progenitor cells from embryonic chick dorsal root ganglia differentiate in vitro to neurons: biochemical and electrophysiological evidence. *EMBO J.* 4; 1709-1714.

H. Rohrer and H. Thoenen, 1987. Relationship between differentiation and terminal mitosis: chick sensory and ciliary neurons differentiate after terminal mitosis of precursor cells, whereas sympathetic neurons continue to divide after differentiation. *J. of Neurosci.* 7; 3739-3748.

T.P. Rothman, M.D. Gershohn and H. Holtzer, 1978. The relationship of cell division to the acquisition of adrenergic characteristics by developing sympathetic ganglion cell precursors. *Dev. Biol.* 65, 322-341.

B. Sakmann and H.R. Brenner, 1978. Change in synaptic channel gating during neuromuscular development. *Nature* 276; 401-402.

S. Schuetze, 1986. Embryonic and adult acetylcholine receptors: molecular basis of developmental changes in ion channel properties. *TINS* 9; 386-388.

G.G. Schofield and S.R. Ikeda, 1988. Sodium and calcium currents of acutely isolated adult rat superior cervical ganglion neurons. *Pflügers Arch.* 411; 481-490.

M. Simonneau, C. Distasi, L. Tauc and C. Poujeol, 1985. Development of ionic channels during mouse neuronal differentiation. *J. Physiol., Paris*, 80; 312-320.

N.C. Spitzer and P.I. Baccaglini, 1976. Development of the action potential in embryo amphibian neurons in vivo. *Brain Res.* 107; 610-616.

N.C. Spitzer and J.E. Lamborghini, 1976. The development of the action potential mechanism of amphibian neurons isolated in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73; 1641-1645.

N.C. Spitzer, 1983. The development of neuronal membrane properties in vivo and in culture. In "Developing and regenerating vertebrate nervous systems"; 41-59. A.R. Liss, Inc., New York.

J. Streit and H.D. Lux, 1987. Voltage dependent calcium currents in PC12 growth cones and cells during NGF-induced cell growth. *Pflügers Arch.* 408; 634-641.

J. Streit and H.D. Lux, 1988. Ca^{2+} current distribution in PC12 cells during NGF-induced differentiation. *Pflügers Arch.* 411 Suppl. 1; R143.

J.A. Strong, A.P. Fox, R.W. Tsien and L.A. Kaczmarek, 1987. Stimulation of protein kinase C recruits covert calcium channels in Aplysia bag cell neurons. *Nature* 325, 714-717.

J. Suda, Y.A. Barde and H. Thoenen, 1978. Nerve growth factor in mouse and rat serum: Correlation between bio-assay and radioimmuno-assay determinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75; 4042-4046.

T. Takai, M. Noda, M. Mishina, S. Shimizu, Y. Furutani, T. Kayano, T. Ikeda, T. Kubo, H. Takahashi, T. Takahashi, M. Kuno and S. Numa, 1985. Cloning, sequencing and expression of cDNA

for a novel subunit of acetylcholine receptor from calf muscle. *Nature* 315, 761-764.

J.C. de la Torre and J.W. Surgeon, 1976. A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique: The SPG method. *Histochem.* 49; 81-93.

A. Wei and L. Salkoff, 1986. Occult *Drosophila* calcium channels and twinning of calcium and voltage-activated potassium channels. *Science* 233; 780-782.

D.A. Weisblat, 1985. Segmentation and commitment in the leech embryo. *Cell* 42; 701-702.

D.L. Wilson, K. Morimoto, Y. Tsuda and A.M. Brown, 1983. Interaction between calcium ions and surface charge as it relates to calcium currents. *J. of Membrane Biol.* 72, 117-130.

Y. Yaari, B. Hamon and H.D. Lux, 1987. Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 235; 680-682.

Lebenslauf

- 31.8.1959 geboren in München, als zweites Kind des Heizungs-
ingenieurs Josef Gottmann und seiner Ehefrau Anna
Gottmann
- 1967-1971 Besuch der Volksschule in München
- 1971-1979 Besuch des Max-Planck-Gymnasiums in München-Pasing
- 1979-1985 Biologiestudium an der Ludwigs-Maximilians-
Universität in München
- 1983-1985 Diplomarbeit über "Der Gott der Amöben": Unter-
suchungen am cAMP-Oszillationssystem von
Dictyostelium discoideum mit Hilfe pH-sensitiver
Mikroelektroden (Prof. Dr. C.N. David)
- 1985 Diplomprüfung in Biologie
- seit 1985 Doktorarbeit in der Abteilung Neurophysiologie am
Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München
(Prof. Dr. H.D. Lux)

Diese Arbeit entstand zwischen Januar 1986 und August 1988 in der Abteilung Neurophysiologie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in Martinsried.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. I. Dietzel-Meyer für ihre unermüdliche Unterstützung des Projekts und für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die neurophysiologische Arbeitsmethodik.

Ebenso gilt mein besonderer Dank für viele anregende Diskussionen dem Leiter der Abteilung für Neurophysiologie, Herrn Prof. Dr. H.D. Lux, auf den auch die grundlegende Konzeption des Projekts zurückgeht.

Weiterhin möchte ich Herrn Dipl.-Math. H. Zucker, dessen universelle Datenaufnahme- und Verarbeitungsprogramme mir die Arbeit sehr erleichtert haben, und Herrn V. Bulka für seine stets hilfreiche Unterstützung danken.

An besonderer Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. F. Zettler für das der Arbeit entgegengebrachte Interesse und Herrn Prof. Dr. H. Wieczorek und Herrn Prof. Dr. C. David für die bereitwillige Übernahme der Berichterstattung danken.

